



Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Bioquímica

# TESIS DOCTORAL

*Función de las tetraspaninas y proteínas del citoesqueleto  
cortical de actina en la entrada del virus de la  
inmunodeficiencia humana (VIH-1)*

Mónica Gordón Alonso

Madrid, 2009



Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid



# TESIS DOCTORAL

## *Función de las tetraspaninas y proteínas del citoesqueleto cortical de actina en la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1)*

Memoria presentada por la licenciada en Bioquímica:

*Mónica Gordón Alonso*

*para optar al grado de*

*Doctora en Ciencias Biológicas*

Directores de tesis:

**Dr. Francisco Sánchez Madrid**

Catedrático de Inmunología de la Universidad Autónoma de Madrid

**Dra. María Yáñez Mo**

Investigadora contratada del Fondo de Investigación Sanitaria

Lugar de realización: **Hospital Universitario de la Princesa, Servicio de Inmunología**



## AGRADECIMIENTOS

Después de todos estos años y todo este trabajo hay mucho que agradecer y mucha gente que destacar. Brevemente y sólo para que conste en acta (nunca mejor dicho) paso a enumerar a las personas que han hecho esto posible, fácil (sólo a veces), divertido (algunos momentos muy memorables) y enriquecedor (casi siempre). Como hay que empezar de alguna manera, empezaré cronológicamente, aunque como ya postuló Einstein, el tiempo es relativo.

En primer lugar las gracias las merecen mis padres (Juani y Floro) y mi familia (Belinda-Ismael, Jose-M., los peques Israel y Carmen, mi prima Amparo, la familia Cadierno-Alonso, mis abuelos, y el resto de tíos y primos de esta numerosa y genial familia) por que siempre han estado ahí para apoyarme, aguantarme e intentar entender este mundillo tan extraño en que me he metido.

En segundo lugar, mis amigas de toda la vida (Raquel, Elenita, Begoña y Montse), que me vieron partir a “los madriles” desde Móstoles para dedicarme a “la ciencia”.

En tercer lugar, a mis amigas y compañeras de martirio, Elena y Patricia, verdaderas sufridoras de todo el proyecto Tesis Doctoral, consejeras de estrategias científicas y no científicas para sobrevivir al proceso de metamorfosis de estudiante de Bioquímica a “Proto-doctora” en Ciencias Biológicas.

También como no, a mis compañeros de laboratorio, muchos de ellos grandes amigos dentro y fuera del Hospital (Mónica Sala, Manolo, Hortensia, Román, Maika, Olga...). Mención especial merecen los PACO’S 1 por el día a día (Manu, Marta, Ursa, Carmen y Esteban) y los futboleros (Samu y los recién incorporados de la 9ª; Alfonso, Ángel, Raquel, Patricia, Edu y Esther entre los Moles; Giulia, Fran, Sales, Enricco, Almudena, Cristina, Vera-Gabriel y Emilio del CNIC; y Carlos y Eduardo de Cecilia’s Lab). Gracias también a mi compañera de piso Cristina, por ignorar el campo de batalla en el que he convertido el salón de casa estos últimos meses.

Agradezco también la labor de mis directores de tesis, el Dr. Francisco Sánchez Madrid que partió una lanza para que pudiese dedicarme a la Inmunología al principio de los tiempos, y la Dra. María Yáñez Mó, que se empeño en rescatarme de los mil proyectos empezados sin rumbo y abandonados al desaliento si no hubiese sido por su ayuda.

Como no dar las gracias a gente que me ha ayudado y guiado a lo largo de esta aventura como David, MiguelVi, Mónica Feijoo, Susana y toda la gente del Gregorio Marañón, Becca y la gente del laboratorio del Dr. Gummuluru...

A la gente que me quitará el trabajo en breve, Josete y Perdiguero, que en nada salvarán al mundo de la amenaza del VIH. Al resto de amigos de los jueves gastronómicos: Joana, Isma y Fiti. A amigos allende los mares como Cristina y Lola, Solivia, Silvia, Raúl y Fernando. A mis profesores a lo largo de toda esta vida dedicada a aprender (Maite, Avelino, Piqueras, Mateo, Elena, Rosario y tantos otros).

A todos ellos, más los que se me olviden, más los que se lo merecen aunque yo no haya sabido apreciarlo, GRACIAS.



## RESUMEN

Un paso crítico en la infección de linfocitos T por el virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1) es la entrada en la célula diana, para la cual sus glicoproteínas reconocen en la superficie celular CD4 y CXCR4/CCR5. Este reconocimiento conduce a la fusión de la envuelta viral con la membrana plasmática celular, permitiendo la entrada de la cápside viral en el citosol.

En este estudio se ha analizado la transmisión del VIH-1 por inducción de fusión celular (formación de sincitios) y la entrada directa de partículas virales. En concreto se ha investigado el papel de las tetraspaninas, proteínas organizadoras de microdominios proteicos en la superficie celular, en la infección de células T por el VIH-1. Así, se ha observado que la presencia de tetraspaninas y EWI-2 (receptor asociado a tetraspaninas) afecta negativamente a la transmisión viral por ambas vías, mientras que, su silenciamiento facilita la entrada del virus y la fusión celular inducida por la envuelta viral (Env<sup>+</sup>). Las conexiones intracelulares de CD81 y EWI-2 parecen relevantes a juzgar por las consecuencias de la expresión de las formas truncadas para la región citoplasmática C-terminal de dichas proteínas. Así, ambas moléculas se asocian con diversas proteínas reguladoras de Actina como  $\alpha$ -Actinina, que también se relocaliza hacia el contacto con la célula Env<sup>+</sup>, y cuyo silenciamiento favorece la entrada del virus.

La molécula PDZ Sintenina-1 se ha descrito asociada a proteínas de la familia de las tetraspaninas. En este estudio se ha demostrado además su capacidad de asociarse al receptor de VIH CD4, así como su reclutamiento a las zonas de transmisión y entrada del virus. Sintenina-1 se relocaliza también en los contactos entre la célula T con la célula presentadora de antígeno de manera dependiente de antígeno. La interferencia de Sintenina inhibe el reclutamiento de CD3 a la sinapsis inmune y la señalización inducida por el antígeno, mientras que facilita la entrada del virus VIH-1 en la célula.

Por otro lado, en nuestro estudio se ha observado que otra proteína reguladora del citoesqueleto de Actina, Drebrina, se asocia al co-receptor CXCR4 del virus. Tanto el silenciamiento de Drebrina como la expresión de una forma truncada carente de su región C-terminal facilitan la fusión celular y la infección viral.

En resumen, se han encontrado importantes analogías entre la estructura molecular de la sinapsis inmunológica y la viral. Así, el VIH-1 podría haber desarrollado una estrategia de entrada semejante a una estructura fisiológica de la célula diana para lograr una transmisión eficaz.





## SUMMARY

A key step in the infection of T lymphocytes by HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1) is the entrance in the host cell. Crucial for this process are the interactions of the viral glycoproteins with the host CD4 and CXCR4/CCR5. These interactions lead to fusion of the viral envelope with the plasma membrane allowing the entry of the viral capsid in the cytoplasm.

The present work has studied transmission of HIV-1 by both induction of syncytia formation, and direct entry of free viral particles. Specifically, the role of tetraspanins, molecules that organize protein microdomains at the cellular surface, in HIV-1 transmission was analyzed. We observed that the presence of tetraspanins and EWI-2 (protein associated with tetraspanins) inhibited viral transmission by both syncytia formation and direct infection, whereas knocking down their expression facilitated viral entry and cell fusion induced by viral envelope (Env). By using truncated mutants of the C-terminal cytoplasmic domain of EWI-2 and tetraspanin CD81 we found that connections with intracellular proteins seemed to be involved in viral transmission. In fact, both molecules associate with proteins that regulate the Actin network such as  $\alpha$ -Actinin.  $\alpha$ -Actinin is recruited to the contacts with the envelope glycoproteins, and knocking down its expression increases viral entry.

The PDZ-protein Syntenin-1 has been described to be associated with some tetraspanins. In the present work we found that Syntenin-1 interacted with the receptor of HIV CD4 and was recruited towards the contacts with the envelope glycoproteins. Moreover, Syntenin-1 was also localized in the immune synapse during antigen recognition and knocking down Syntenin-1 expression inhibited CD3 recruitment to the immune synapse and antigen- induced signalling but increased viral entry.

We also found another protein that regulates the Actin network, Drebrin, associated with CXCR4, a co-receptor of HIV-1. Both, knocking down Drebrin or expressing a truncated mutant of this protein without the C-terminal region increased syncytia formation induced by the viral envelope and viral infection.

All the molecules studied are involved in both the immune synapse and the viral synapse. Hence, HIV-1 may have developed an entry strategy by copying physiological structures used by its targets cells in order to spread efficiently.



## ÍNDICE

---



# ÍNDICE

Abreviaturas .....	i
INTRODUCCIÓN .....	1
1. La membrana plasmática .....	1
1.1 Las tetraspaninas como organizadoras de microdominios en la membrana plasmática .....	2
A) CD81 en el sistema inmune y procesos infecciosos .....	3
B) EWI-2 y su relación con las tetraspaninas CD9 y CD81 .....	3
1.2 Proteínas que enlazan la membrana plasmática y el citoesqueleto de Actina .....	4
A) $\alpha$ -Actinina .....	4
B) Sintenina-1 .....	5
C) Drebrina .....	5
2. El virus VIH-1 .....	5
2.1 Características del VIH-1 y SIDA .....	6
2.2 Mecanismos de propagación del VIH-1 .....	8
2.3 El ciclo viral del VIH-1 .....	9
2.4 Mecanismo de entrada del VIH-1 .....	10
3. El citoesqueleto de Actina, la membrana plasmática y la entrada del VIH-1 .....	12
4. Analogías entre la sinapsis inmunológica y la sinapsis viral .....	13
OBJETIVOS .....	17
MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
RESULTADOS .....	35
1. Análisis de la formación de sincitios inducida por la envuelta viral de VIH-1 .....	35
2. Papel de las tetraspaninas en la infección de linfocitos T por VIH-1 .....	35
2.1 Las tetraspaninas se localizan en las zonas de contacto de la envuelta viral con la célula diana .....	35
2.2 Los anticuerpos anti-CD9 y anti-CD81 aumentan la fusión de membranas inducida por la envuelta viral y la infección .....	38
2.3 La interferencia de CD9 y CD81 aumenta la formación de sincitios inducida por la envuelta viral y la infección .....	41
2.4 La sobreexpresión de CD9 y CD81 reduce la formación de sincitios inducida por la envuelta viral .....	43
2.5 Estudio de los mecanismos por los que la interferencia de CD81 aumenta la fusión celular inducida por la envuelta viral .....	44

2.6 Implicación de la región citoplasmática C-terminal de CD81 en el ciclo del VIH-1 .....	46
2.7 Papel de EWI-2, proteína asociada a CD81, en la fusión celular inducida por la envuelta viral y la infección .....	48
3. Estudio del papel de proteínas intracelulares asociadas a la membrana y al citoesqueleto de Actina en la fusión e infección por VIH-1 .....	49
3.1 $\alpha$ -Actinina en la infección viral .....	49
3.2 Sintenina-1 afecta a la entrada e infección del VIH-1 .....	52
3.3 Interacción virus-célula y el papel de Sintenina-1 .....	54
3.4 Sintenina-1 y la sinapsis inmune .....	57
3.5 La Drebrina en la infección viral y la sinapsis inmune .....	60
DISCUSIÓN .....	67
1. Las tetraspaninas y la fusión de membranas inducida por la envuelta viral ...	67
1.1 El tropismo del virus y las tetraspaninas .....	68
1.2 La cooperatividad del proceso de fusión de membranas .....	69
1.3 Las tetraspaninas CD9 y CD81 en el ciclo del VIH-1 .....	69
1.4 Implicación de EWI-2, receptor asociado a CD9 y CD81, en la transmisión del VIH-1 .....	72
2. El citoesqueleto y la infección por VIH-1 .....	73
2.1 Efecto de $\alpha$ -Actinina en la transmisión del VIH-1 .....	74
2.2 Sintenina-1 en el ciclo del VIH-1 y la sinapsis inmunológica .....	75
2.3 Drebrina y el VIH-1 .....	76
2.4 Modelo final .....	77
CONCLUSIONES .....	81
BIBLIOGRAFÍA .....	85
TEXTO SUPLEMENTARIO (Leyendas de los vídeos) .....	95
ARTÍCULOS PUBLICADOS POR LA DOCTORANDA .....	99
ANEXO I (Artículos incluidos en la tesis) .....	105







## ABREVIATURAS

**(Para las abreviaturas se ha utilizado la nomenclatura española en aquellos casos en los que existe, y la inglesa para el resto de casos. Muchos acrónimos corresponden a palabras en inglés)**

Ac: Anticuerpo  
AcM: Anticuerpo monoclonal  
BCR: Receptor de la célula B  
BSA: Albumina bovina de suero  
CDV: Virus del moquillo Canino  
CPA: Célula Presentadora de Antígeno  
CXCR4: Receptor 4 de quimiocinas (motivo C-X-C)  
CCR5: Receptor 5 de quimiocinas (motivo C-C)  
DRMs: Membranas Resistentes a Detergentes  
ELISA: Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas  
ERKs: Quinasas reguladas por señales extracelulares  
ERMs: Familia de proteínas Ezrina-Radixina-Moesina  
FBS: Suero fetal bovino  
FITC: Isotiocianato de fluoresceína  
FIV: Virus de la Inmunodeficiencia Felina  
G418: Geneticina  
GAM: Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón  
GAR: Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo  
GEF: Factor intercambiador de GDP por GTP  
GFP: Proteína fluorescente verde  
GP120/GP41: Glicoproteínas 120 y 41  
GPI: Fosfolípido glicosilinositol  
HRP: Peroxidasa de rábano picante  
HTLV-1: Virus de la leucemia T humana-1  
ICAM-1/3: Molécula de adhesión intercelular 1/3  
Ig: Inmunoglobulina  
IL-2: Interleuquina 2  
kDa: kiloDalton  
LFA-1: Antígeno asociado a la función linfocitaria-1  
LEL: Bucle extracelular largo  
LTR: Repeticiones terminales largas (promotor del VIH-1)  
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad  
MTOC: Centro organizador de microtúbulos

PAK-2: Quinasa 2 activada por p21 (Rac/Cdc42)

PBLs: Linfocitos de sangre periférica

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Solución salina de fosfatos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDZ: Tipo de dominio proteico; las siglas provienen de las iniciales de las tres proteínas que se describieron inicialmente con este dominio (PSD-85; Discs large; Zonula occludens-1)

PE: Ficoeritrina

PHA: Fitohematoglutinina

PI4K: Fosfatidilinositol 4-quinasa

PIP2: Fosfoinositol 4,5 difosfato

PKC: Proteína quinasa C

PLC $\gamma$ : Fosfolipasa C  $\gamma$

SD: Desviación estándar

SDF-1: Factor derivado de células estromales-1

SEE: Superantígeno E

SEL: Bucle extracelular corto

SI: Sinapsis inmunológica

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SMAC: Complejo supramolecular de activación

    cSMAC: Complejo supramolecular de activación central

    pSMAC: Complejo supramolecular de activación periférico

TBS: solución salina de Tris

TCR: Receptor de la célula T

TEMs: Microdominios Enriquecidos en Tetraspaninas

Th1: Linfocito T colaborador de tipo 1

Th2: Linfocito T colaborador de tipo 2

TM4: Tetraspaninas

VHC: Virus de la Hepatitis C

VIH-1: Virus de la Inmunodeficiencia Humana-1

VLPs: Partículas pseudovirales

WB: Western Blot

ZAP-70: Quinasa asociada a la cadena Z-70

# INTRODUCCIÓN

---

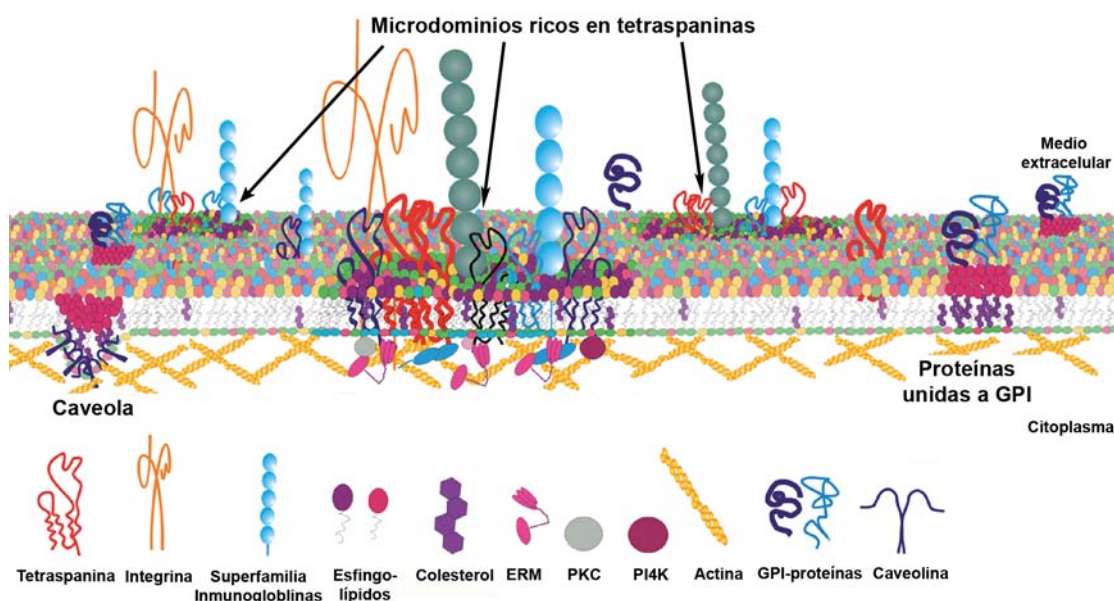


## INTRODUCCIÓN

### 1. LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La membrana plasmática no es sólo una barrera física sino una estructura fundamental para la comunicación de la célula con el medio externo. El modelo de mosaico fluido para la organización de la membrana plasmática propone una bicapa lipídica con una cierta viscosidad, donde se insertan las distintas proteínas transmembrana, permitiendo la libre difusión de proteínas y lípidos a lo largo de la membrana [1]. Sin embargo, este modelo minusvalora el papel estructural de las proteínas transmembrana y se basa en un equilibrio termodinámico que no explica los procesos biológicos finamente regulados que deben ocurrir en la célula. Por el contrario, la membrana posee una distribución organizada que se mantiene gracias a las interacciones con el citosqueleto de Actina e interacciones lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína dentro de la bicapa.

Clásicamente se ha empleado la extracción con detergentes y la separación de fracciones enriquecidas en lípidos mediante gradientes de sacarosa para el estudio de dominios de membrana. Así, se han identificado plataformas lipídicas resistentes a detergentes denominadas DRMs (*Detergent Resistant Microdomains*) que se caracterizan por tener un alto contenido en colesterol y esfingolípidos, lo que les permite un mayor empaquetamiento [2]. Sin embargo, estas fracciones en realidad engloban un conjunto heterogéneo de componentes que incluyen nanodominios de proteínas GPI (proteínas unidas covalentemente a Glicosil-Fosfatidil-Inositol, y ancladas por éste a la membrana), caveolas, dominios de flotilinas y microdominios ricos en tetraspaninas (TEMs), objeto de estudio de esta tesis doctoral (**Figura 1**) [3].

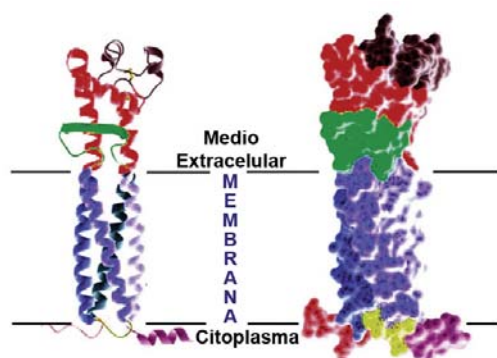


**Figura 1. Microdominios diferenciados en la membrana plasmática.** Se pueden distinguir caveolas, microdominios formados por proteínas-GPI, y microdominios enriquecidos en tetraspaninas (TEMs). Modificado a partir de Yañéz-Mó et al. 2009.

Los TEMs son microdominios enriquecidos en proteínas transmembrana de la familia de las tetraspaninas, que se encuentran en todas las células de organismos eucariotes y algunos procariotes, con una composición muy variada.

### 1.1 Las tetraspaninas como organizadores de microdominios en la membrana plasmática

Las tetraspaninas forman una amplia familia de proteínas con poca homología de secuencia pero estructuras secundaria y terciaria conservadas, que se encuentran en todos los tipos celulares en un alto número de copias. La estructura que caracteriza a esta familia consta de cuatro dominios transmembrana (TM1-4, en azul en la **Figura 2** [4]), donde se encuentra la mayor homología de secuencia entre las distintas tetraspaninas, dos bucles extracelulares (SEL (*small extracellular loop*, en verde) y LEL (*large extracellular loop*, en rojo y marrón), un bucle intracelular corto y los extremos N-terminal y C-terminal ambos citoplasmáticos. Además, todas ellas cuentan con Cisteínas palmitoilables en regiones yuxtamembrana. La región LEL contiene de dos a cuatro puentes disulfuro altamente conservados que mantienen la estructura secundaria compartida: tres  $\alpha$ -hélices (región roja) y una región hipervariable (en marrón).



**Figura 2. Estructura molecular de las tetraspaninas.** A la izquierda se muestra la estructura secundaria y a la derecha la estructura terciaria. Modificado a partir de Seigneuret et al. 2006.

La mayoría de las interacciones que establecen las tetraspaninas entre ellas o con otras proteínas transmembrana (principalmente integrinas y moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas) se producen a través del LEL. Casi todas las interacciones descritas tienen lugar en *cis* por lo que las tetraspaninas y las proteínas asociadas se agrupan formando los llamados microdominios de membrana enriquecidos en tetraspaninas o TEMs [5]. Además, las tetraspaninas interactúan con algunos lípidos, principalmente colesterol y gangliósidos, por lo que pueden hallarse en DRMs [6]. Los TEMs son abundantes en estructuras ricas en Actina como los microvilli y los contactos intercelulares. Algunas tetraspaninas, como CD81, se asocian a las ERM (Ezrin-Radixin-Moesin), una familia de proteínas que conectan la membrana con el citoesqueleto de actina [7].

Los TEMs se han desvelado como unidades funcionales preorganizadas en la membrana plasmática ya que las interacciones que establecen las tetraspaninas con otras proteínas influyen en la dinámica de difusión de estas proteínas modulando sus funciones biológicas [3, 8].

Las tetraspaninas se han implicado en un gran número de procesos biológicos, la mayoría relacionados con adhesión celular (a la matriz, entre células o a patógenos), fusión de membranas, comunicación intercelular o señalización intracelular [5, 9-12]. En muchos casos,

las tetraspaninas transmiten señales intracelulares cuando un receptor asociado en *cis* con ellas interacciona con su ligando. Se ha descrito la asociación de las regiones citoplasmáticas de las tetraspaninas con distintas proteínas señalizadoras como Hck y Lyn [13], PI4K [14] y PKC [15]. En otros casos, las tetraspaninas modulan la función de las proteínas a las que se asocian como las integrinas y sus ligandos, [16-18] o las metaloproteasas [8, 19].

En la respuesta inmunológica, las tetraspaninas desempeñan funciones importantes al asociarse con proteínas como MHC (complejo principal de histocompatibilidad), CD3, CD4, CD8, BCR (receptor de células B), o LFA-1 (integrina exclusiva de leucocitos) [5, 6]. Además, muchas tetraspaninas se relacionan con procesos patológicos, normalmente en la transmisión de virus por formación de sincitios, como CD82 y el virus de la leucemia T humana (HTLV-1) [20], y CD9 y los virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) [21] y del moquillo canino (CDV) [22]. Otras tetraspaninas están directamente relacionadas con la infección de diversos virus. Éste es el caso de la tetraspanina CD63, implicada en la infección de macrófagos por el VIH-1 [23], y la tetraspanina CD81, receptor del virus de la hepatitis C (VHC) [24].

### **A) CD81 en el sistema inmune y procesos infecciosos**

CD81 es una tetraspanina ubicua con una alta expresión en las membranas plasmáticas de linfocitos B y T, células dendríticas y macrófagos [25, 26]. En linfocitos T esta tetraspanina se asocia físicamente a CD4 o CD8 [27], actúa como molécula co-estimuladora [28, 29] y promueve el reconocimiento T-B vía LFA-1 [18].

Previamente, CD81 se ha implicado en diversos procesos virales. Así, se ha descrito su unión directa a la proteína E2 del virus de la hepatitis C (VHC) interviniendo en la entrada del virus [24], que los anticuerpos anti-CD81 inhiben la formación de sincitios inducida por el HTLV-1 [30] y que CD81 está presente en las vacuolas donde se ensamblaba el VIH-1 M-trópico incorporándose a la envuelta viral durante su salida [26]. Su función co-estimuladora de linfocitos T hace que anticuerpos anti-CD81 sean capaces de activar la transcripción del provirus de VIH-1 si éste está integrado en el genoma celular [31]. Además, CD81 junto con CD9 (tetraspanina muy semejante a CD81) se habían descrito en otros procesos de fusión celular como la formación de miotubos en el músculo [32], la fusión de gametos [33] y la de fagocitos mononucleares en pulmón y hueso [34].

### **B) EWI-2 y su relación con las tetraspaninas CD9 y CD81**

EWI-2 es una molécula perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) que se asocia estrechamente a las tetraspaninas CD9, CD81 [35] y CD82 [36]. Esta proteína se caracteriza por tener cuatro dominios inmunoglobulina en su región extracelular donde se encuentra la secuencia que le da nombre (los aminoácidos Glu-Trp-Ile), un segmento transmembrana y una región citoplasmática formada por diez aminoácidos (**Figura 3**).

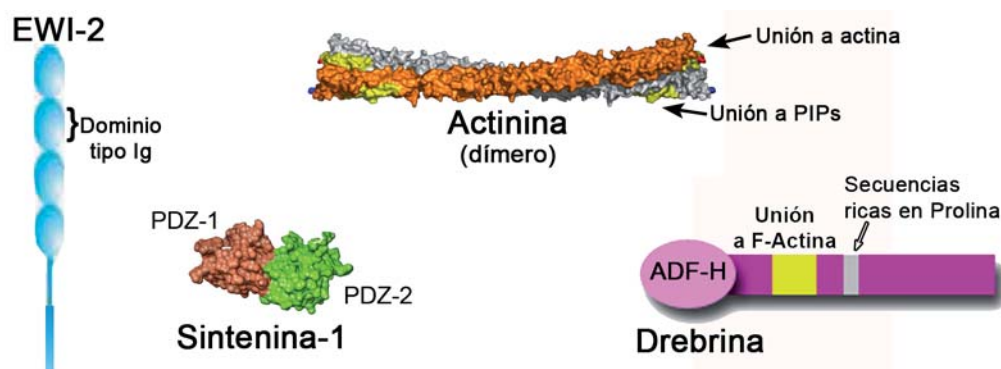


Figura 3. Estructura de EWI-2,  $\alpha$ -Actinina, Sintenina-1 y Drebrina con sus dominios más importantes.

Dada su asociación a tetraspaninas, EWI-2 se encuentra en los TEMs, donde es capaz de modular la actividad de algunas integrinas presentes en estos microdominios [37, 38]. Así, la sobreexpresión de EWI-2 reduce la migración y motilidad de distintas células [36, 37], mientras que su silenciamiento aumenta la polaridad y la migración quimiotáctica de células T [7]. Además, recientemente se ha demostrado la asociación de esta proteína con las ERMs, estableciendo un vínculo entre los TEMs y el citoesqueleto de Actina [7].

## 1.2 Proteínas que enlazan la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina

La membrana plasmática está íntimamente relacionada con el citoesqueleto de actina subcortical. Muchas de las proteínas transmembrana se asocian directa o indirectamente con los filamentos de Actina. Estos nexos aseguran la correcta interrelación entre las dos estructuras. Así, señales que llegan a la membrana se traducen en cambios en el citoesqueleto y viceversa [39]. Las tetraspaninas y algunas proteínas asociadas a ellas como EWI-2 y las integrinas, se anclan al citoesqueleto de actina mediante proteínas como las ERMs, Talina,  $\alpha$ -Actinina y Filamina [7, 40].

### A) $\alpha$ -Actinina

$\alpha$ -Actinina es una proteína de unión a F-Actina que pertenece a la superfamilia de la Espectrina. Esta proteína funciona como un dímero anti-paralelo, dejando un dominio de unión a Actina en cada extremo del dímero [41] (**Figura 3**). Además,  $\alpha$ -Actinina interacciona con distintos fosfoinosítidos que regulan negativamente su actividad entrecruzadora de filamentos de Actina [42].

En células T,  $\alpha$ -Actinina está implicada en procesos de migración celular al conectar moléculas de adhesión con el citoesqueleto cortical de Actina [40, 43]. Existen varias isoformas de esta proteína, las más relevantes parecen ser la 1 y la 4 en linfocitos T [43]. Ambas isoformas interaccionan con fosfoinosítidos.



## B) Sintenina-1

Sintenina-1 es una proteína adaptadora que posee dos dominios PDZ (*Postsynaptic density, Discs large and Zonula occludens*) por los que se une a Sindecano [44], a PIP2 (fosfoinositol-4,5-bisfosfato) [45] y a la tetraspanina CD63 [46] (**Figura 3**). El sitio de unión de PIP2 precisa de ambos dominios PDZ y se superpone con el sitio de unión a otras proteínas por lo que se ha propuesto PIP2 como un posible regulador de la función adaptadora de Sintenina-1 [45].

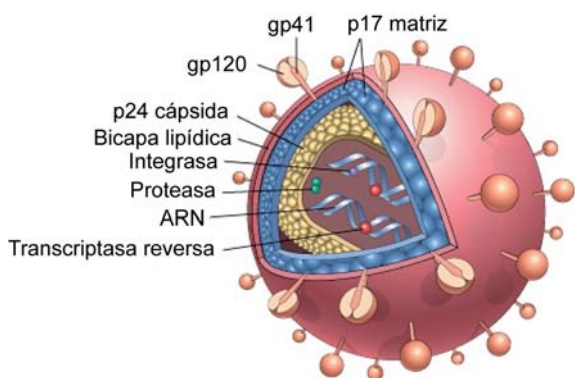
Esta proteína se ha implicado recientemente en procesos de metástasis, función neuronal, y tráfico vesicular [47].

## C) Drebrina

La Drebrina es una proteína de unión a F-actina principalmente estudiada en el sistema nervioso, donde regula la polimerización de actina, interviniendo en procesos tan importantes como la plasticidad de las neuritas y la morfogénesis neuronal [48]. Posee un dominio homólogo a factores despolimerizadores de Actina (ADF-H) en su región N-terminal y un dominio de unión a Actina en su zona central junto con una región rica en Prolinas que está implicada en la interacción con proteínas efectoras (**Figura 3**). A pesar de su dominio ADF-H, no despolimeriza F-Actina, pero sí compete con moléculas estabilizadoras de filamentos como Tropomiosina en la unión a F-Actina.

## 2. EL VIRUS VIH-1

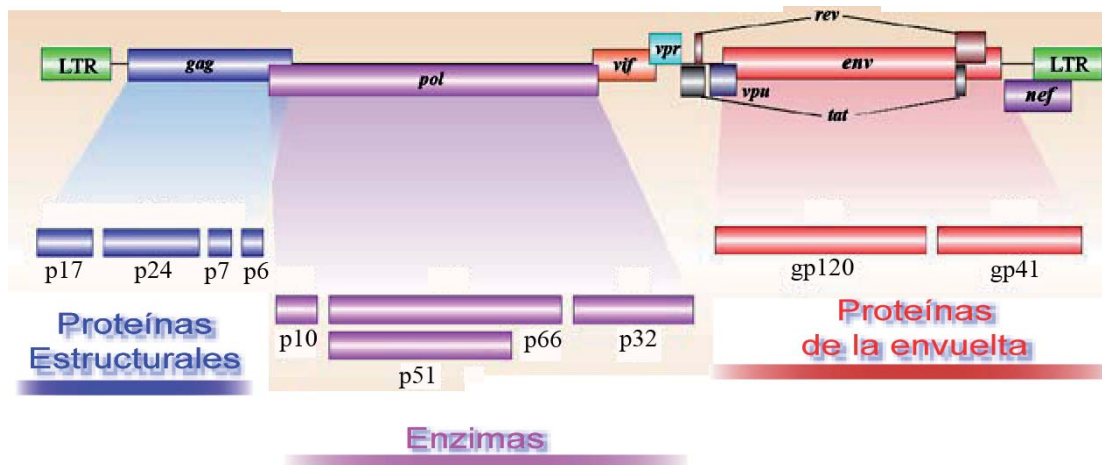
El VIH-1 o virus de la inmunodeficiencia humana-1, pertenece a la familia de los retrovirus, virus ARN con envuelta, que comparten características estructurales y replicativas [49]. Las partículas virales de esta familia tienen diámetros de 80-100 nm y muestran en su envuelta lipídica externa las glicoproteínas virales (**Figura 4**).



**Figura 4. Estructura de una partícula viral de VIH-1.** Modificado a partir de Elsevier Science (USA) 2002.

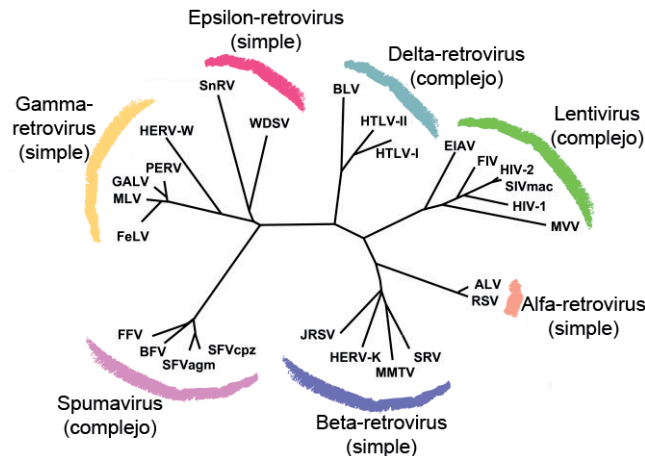
Cada partícula viral contiene una o varias copias del genoma viral en forma de ARN lineal de una sola hebra y polaridad positiva. El ARN lineal se replica mediante una transcripción reversa del ARN genómico viral en ADN de doble hebra y la subsiguiente integración de este ADN en el genoma de la célula infectada. El genoma de todos los retrovirus contiene cuatro regiones codificantes principales: *gag*, que codifica para las proteínas virales internas que forman la matriz (p17), la cápside (p24) y el

núcleo (p7 y p6); *pro*, que genera la proteasa viral (p10); *pol* que contiene la información para la transcriptasa reversa (p66-p51) y la integrasa (p32); y *env*, que se traduce en las glicoproteínas virales (gp120-gp41) que se insertan en la envuelta del virus (**Figura 5**).



**Figura 5.** El genoma del VIH-1 y las proteínas virales que codifica. Modificado a partir de [www.stanford.edu](http://www.stanford.edu)

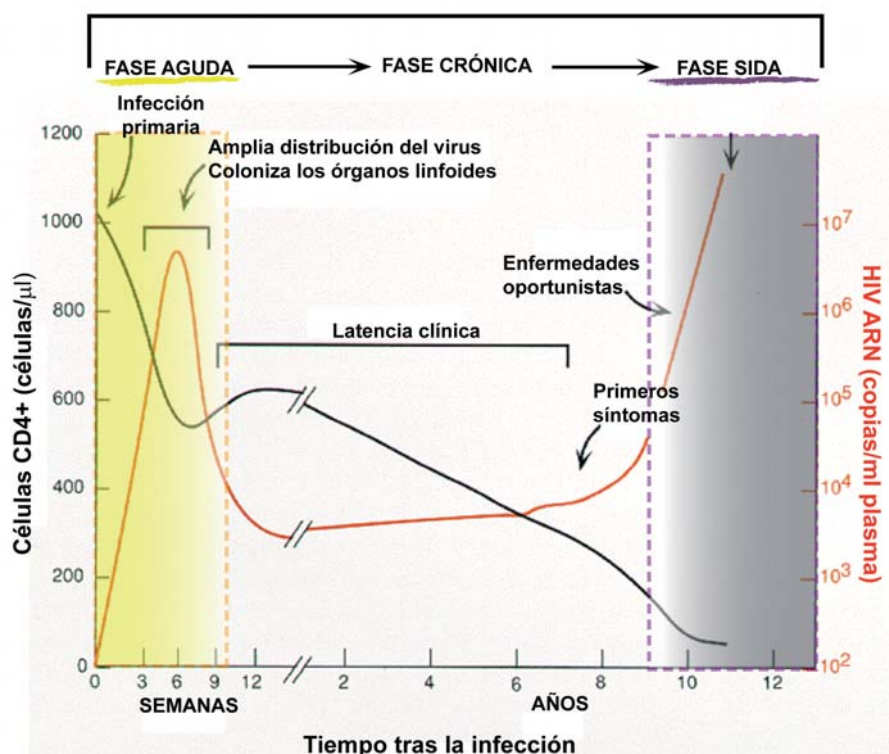
Además, los retrovirus más complejos poseen otros genes que codifican para proteínas reguladoras adicionales mediante *splicing* alternativo. Uno de estos retrovirus complejos es el VIH-1, que pertenece al género de Lentivirus (virus con períodos de incubación largos), grupo Primates (**Figura 6**).



**Figura 6.** Árbol filogenético de la familia Retrovirus. Modificado a partir de [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)

## 2.1 Características del VIH-1 y SIDA

El VIH-1 se identificó como el agente infeccioso causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) [50]. Esta enfermedad se caracteriza por tener tres fases muy diferentes (**Figura 7**): fase aguda, que cursa como una infección vírica normal; fase crónica, con baja viremia que puede resultar prácticamente asintomática y durar más de diez años; y fase SIDA, donde se producen la mayoría de los síntomas asociados a una inmunodeficiencia grave y que se caracteriza por una leucopenia acusada de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.



**Figura 7. Etapas de la enfermedad causada por el VIH-1.** En el eje de la derecha se muestra la viremia y en el de la izquierda el contenido de linfocitos CD4<sup>+</sup> en sangre del paciente. Modificado a partir de la revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.

Como todos los virus con envuelta, el VIH-1 necesita atravesar dos membranas, la viral y la celular, para introducir su material genético en la célula diana. Este proceso determina, no sólo la eficiencia de infección y expansión del virus, sino la especie hospedadora y el tropismo celular. La envuelta del VIH-1 contiene complejos glicoproteicos virales formados por dos subunidades: gp120 o subunidad superficial, y gp41 o subunidad integral. Este complejo reconoce con alta especificidad el CD4 humano (receptor) y un receptor de quimiocinas (co-receptor) CXCR4 o CCR5, esenciales para la entrada del virus en la célula [51]. La subunidad gp120 determina el tropismo celular del virus:

- **Tropismo T:** la subunidad gp120 interacciona con CD4 y posteriormente con CXCR4. Así, los virus con esta envuelta infectan principalmente linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>. Muchos virus T-trópicos tienen la capacidad de inducir la fusión de células infectadas con células no infectadas CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>, por lo que se les denomina virus inductores de sincitios.
- **Tropismo M:** la subunidad gp120 reconoce CD4 y posteriormente CCR5, lo que determina que estos virus puedan infectar el linaje monocítico y otras células presentadoras de antígeno como las células dendríticas. Su diana principal son los macrófagos.

Esta división trópica es en realidad flexible dado que existen algunas cepas con tropismo dual, capaces de utilizar cualquiera de los dos co-receptores; todas las cepas aisladas son capaces

de infectar linfocitos T activados de sangre periférica, ya que éstos expresan CCR5 y CXCR4; y el tropismo viral puede variar a lo largo de la replicación del virus debido a su alta tasa de variación génica (una única mutación puntual en la secuencia del bucle V3 de gp120 se ha relacionado con cambios en el tropismo viral [52]).

La mayoría de los virus que se encuentran durante la fase aguda de la enfermedad son M-trópicos. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo emergen virus T-trópicos capaces de inducir la formación de sincitios entre células infectadas y células diana no infectadas, que contribuyen a la depleción de células T CD4<sup>+</sup>. Se ha observado que en todas las fases de la enfermedad, se produce una disfunción generalizada de las funciones de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tanto en células infectadas como en no infectadas [53]. La proliferación y la activación de células T en respuesta a diversos estímulos se van alterando progresivamente. Primero, los linfocitos T pierden la capacidad de respuesta a antígenos solubles, luego a alo-antígenos y por último a mitógenos. Esto se debe en parte a la acción directa del virus sobre las células T (menor producción de IL-2, inhibición de la expresión del receptor de IL-2, anergia, apoptosis, etc) y en parte, por los efectos del virus sobre las células presentadoras de antígeno [54]. Además, el VIH-1 altera la respuesta T desplazando la respuesta Th1 hacia una respuesta de tipo Th2 inapropiada para una infección viral [55].

## 2.2 Mecanismos de propagación del VIH-1

El VIH-1 puede transmitirse utilizando distintos mecanismos [56, 57]:

- Infección directa por fusión de partículas virales libres con células diana. Este proceso se bloquea cuando la temperatura desciende quedando anclado el virus a la célula sin proseguir el ciclo [58].
- Transmisión de célula a célula. Los contactos celulares son aprovechados por el virus para aumentar en varios órdenes de magnitud la eficacia de la infección. Dentro de esta categoría caben destacar dos modos:
  - Sinapsis virológica. Sucede entre una célula T infectada y otra no infectada. Tiene una gran semejanza estructural y molecular con la sinapsis inmune.
  - Trans-infección. Sucede entre una célula dendrítica no infectada pero portadora de virus infectivos y una célula diana.
- Formación de sincitios por fusión de membranas Env<sup>+</sup> de células infectadas con membranas CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>-CCR5<sup>+</sup> de células no infectadas. Este proceso se favorecería en nichos con una alta densidad celular como los órganos linfoides. Al igual que en la transmisión de célula a célula, esta vía de propagación depende en gran medida de las membranas celulares, el citoesqueleto de actina y proteínas de adhesión intercelular [59-62].

- Transmisión vertical de la madre al feto durante el embarazo, el parto o la lactancia [63].
- Infección por captación de cuerpos apoptóticos que contienen virus infectivos. Esta vía parece ser especialmente importante en los nódulos linfáticos por parte de neutrófilos y macrófagos que fagocitan restos de células infectadas [64].

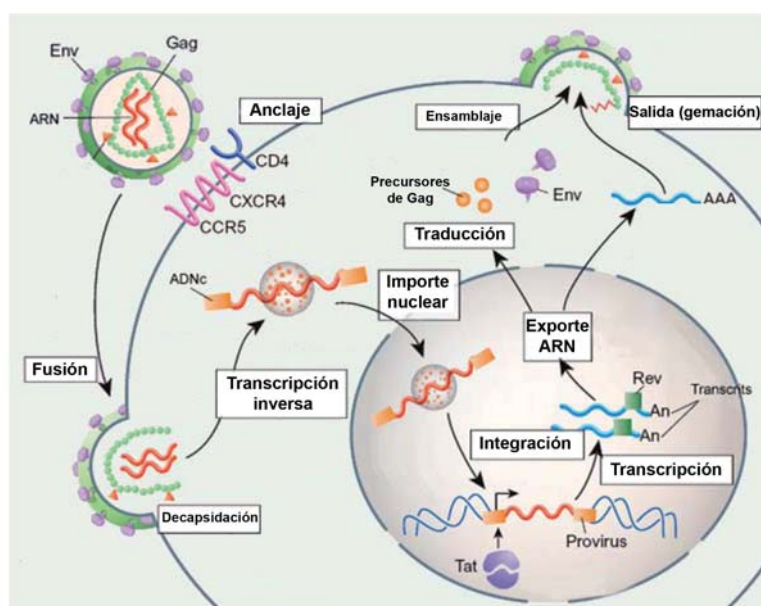
### 2.3 El ciclo viral del VIH-1

El VIH-1 se caracteriza por entrar y salir de la célula mediante procesos de fusión de membranas, sin producir la lisis de la célula diana. El ciclo viral de VIH-1 consta de varias etapas (**Figura 8**):

- Fijación a la célula diana a través de múltiples interacciones de alta afinidad entre los complejos gp120/gp41 y CD4-CXCR4/CCR5. Las partículas virales producen el reclutamiento de CD4 y CXCR4/CCR5 a la zona de fijación, fenómeno conocido como *capping* [65].
- Fusión de membranas e introducción de la cápside viral en el citosol. Se produce el desensamblaje de la cápside dejando libre en el citosol el ARN viral asociado a la retrotranscriptasa y otras proteínas no glicosiladas.
- Retrotranscripción del genoma viral a ADN de doble hebra. La retrotranscripción tiene lugar en el citosol y conlleva dos saltos de la transcriptasa reversa del extremo 5' al 3' para duplicar las secuencias finales del ARN viral y así generar dos extremos con secuencias en tándem que forman los LTR (*long terminal repeats*). Los LTRs funcionan como promotores de los genes virales, regulando por tanto, la traducción, replicación y patogénesis. Esta etapa, junto con la de integración, proveen al virus de su alta capacidad mutagénica. El ADN viral se transporta finalmente al núcleo.
- Integración del ADN viral (provirus: LTR-gag-pol-env-LTR) en el genoma celular por medio de la integrasa viral. Este proceso es mutagénico por sí mismo y puede originar la activación o inhibición de genes celulares, por lo que la patogenia del VIH-1 se asocia a menudo con ciertos tipos de tumores. El factor viral *Tat* actúa como transactivador del LTR induciendo la transcripción del provirus vía la ARN-polimerasa-II celular. Una vez integrado el provirus puede permanecer latente, replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva. La replicación viral está altamente regulada y depende tanto de factores virales como celulares [66]. Mediante procesamiento alternativo del transcrito de ARN completo, el VIH-1 genera los diferentes ARN mensajeros que se requieren para la expresión de sus diferentes proteínas.



- Síntesis masiva de las proteínas virales, seguida de procesamiento proteolítico por parte de la proteasa viral y proteasas celulares, y modificación postraducciona.
- Ensamblaje de nuevos viriones en la periferia celular, proceso dirigido fundamentalmente por la proteína viral *Gag*. Los complejos glicoproteicos de la envuelta viral (*Env*) están ya integrados en la membrana plasmática y se acumulan en las zonas ricas en *Gag*.
- Salida de las nuevas partículas virales por gemación de forma que los nuevos viriones quedan recubiertos por membrana plasmática celular *Env*<sup>+</sup> que pasa a ser la envuelta viral. En este proceso el virus adquiere proteínas celulares transmembrana y citosólicas como tetraspaninas, ERM, y actina [67, 68]. La incorporación de ciertas proteínas celulares en la envuelta viral puede aumentar [69, 70] o disminuir [71] la infectividad de los nuevos viriones. Los virus liberados al medio extracelular son inmaduros, su cápside no está densamente empaquetada. Después de su salida de la célula se produce la maduración del virus por condensación de su núcleo interno [72].

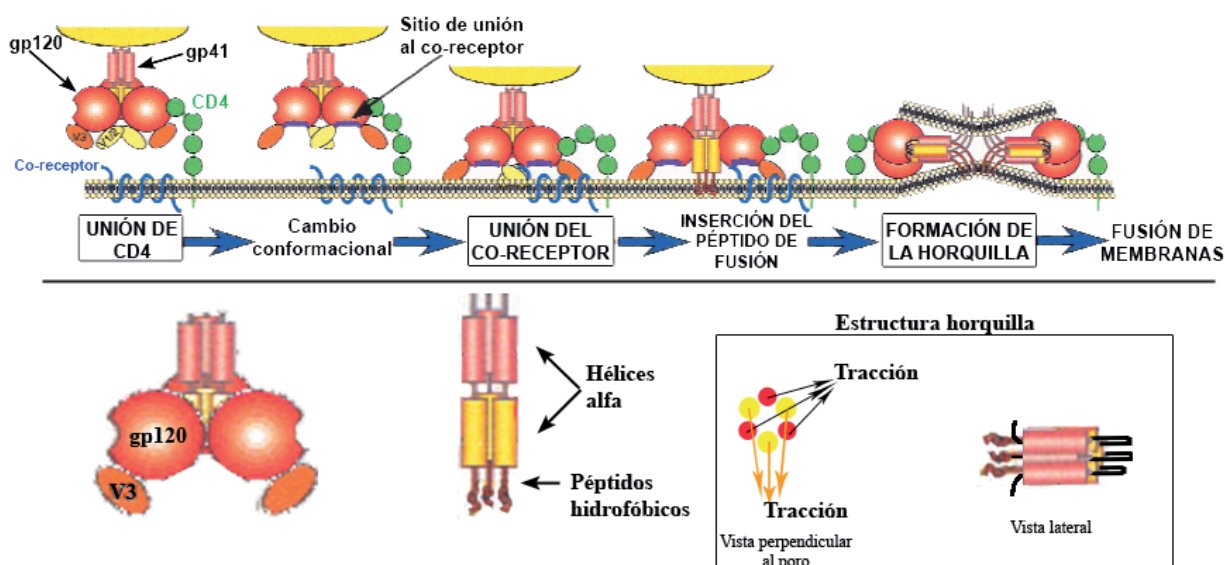


**Figura 8.** Esquema de las distintas etapas del ciclo del VIH-1. Modificado a partir de [www.educa.madrid.org](http://www.educa.madrid.org).

## 2.4 Mecanismo de entrada del VIH-1

El VIH-1 es capaz de fijarse a células CD4<sup>+</sup> pero, como todos los lentivirus de primates, necesita un segundo receptor en la superficie celular para penetrar en la célula diana [51]. A través de múltiples interacciones entre la envuelta viral (que funciona en unidades triméricas) y los receptores y co-receptores celulares, el VIH-1 es capaz de fusionar la membrana celular con su propia envuelta lipídica [73, 74]. El modelo de fusión de membranas actualmente aceptado consta de varias fases (**Figura 9**):

- Interacción de gp120 con CD4. Este reconocimiento molecular induce un cambio conformacional en gp120, que expone los residuos responsables del reconocimiento del co-receptor (CXCR4/CCR5), y en gp41, que adquiere la conformación de pre-horquilla, diana de los péptidos-C inhibidores de fusión como el T20. Además, tratamientos que afecten a la composición lipídica de la membrana o al citoesqueleto de actina (drogas específicas, temperatura, etc) bloquean el proceso de fusión de membranas en este paso.
- Interacción de gp120 con el co-receptor. La unión de gp120 al co-receptor genera la disociación de gp120-gp41. La subunidad gp41 se desdobra (estructura de horquilla), exponiendo su péptido de fusión hidrofóbico.
- Inserción de los péptidos de fusión en la membrana de la célula diana. Tras esta inserción, las hélices  $\alpha$  que forman la subunidad gp41 tienden a volver a plegarse una sobre la otra, ejerciendo una fuerza de tracción que acerca la membrana plasmática y la envuelta lipídica viral.
- Formación del poro inicial. La fuerza de tracción de múltiples estructuras horquilla entre las dos estructuras bilipídicas se propone como la causa de la fusión de estas estructuras formando un poro.
- Ensanchamiento del poro. Para que la cápside de VIH-1 se introduzca en el citosol, el poro debe adquirir un diámetro de unos 50 nm. Esto se consigue por la sucesiva inclusión en el poro original de estructuras horquilla de otros trómeros de gp41 en la misma conformación. Algunas mutaciones en la región flexible de gp41 bloquean la fusión en este paso.



**Figura 9. Modelo del mecanismo de fusión de membranas inducido por la envuelta viral.** En la parte inferior se puede observar en detalle los cambios conformacionales de la glicoproteína gp41 a lo largo del proceso. Cada círculo amarillo o rosa de la vista perpendicular representa una hélice alfa de gp41. Modificado a partir de Doms & Trono 2000.

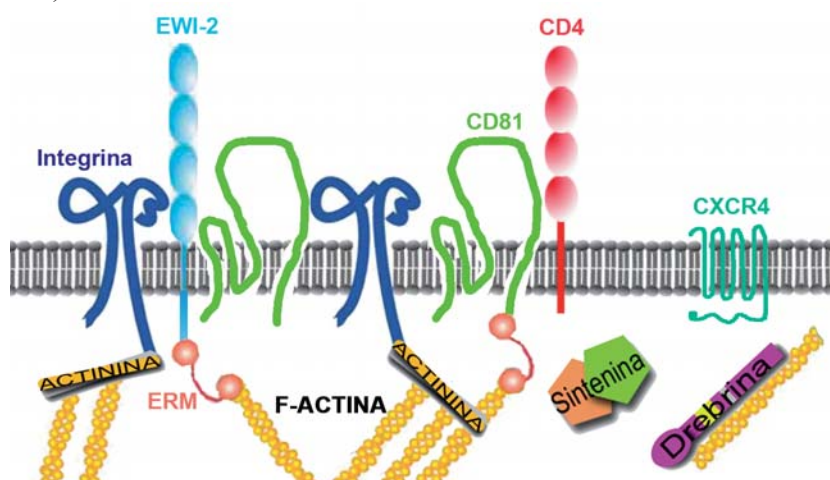
### 3. EL CITOESQUELETO DE ACTINA, LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y LA ENTRADA DEL VIH-1

Progresivamente se ha ido desvelando cómo muchos virus, entre ellos el VIH-1, aprovechan el citoesqueleto celular para su transmisión [75]. Los primeros trabajos que observaron la importancia del citoesqueleto de actina en la entrada del VIH-1 se basaron en el tratamiento con inhibidores de la polimerización o despolimerización de la Actina [65, 76]. Este tratamiento bloquea el reclutamiento de CD4, CXCR4 y LFA-1 tras el contacto con la envuelta viral, tanto utilizando partículas virales libres (impidiendo el fenómeno de *capping*), como en contactos intercelulares. La formación de sincitios se ve especialmente reducida al utilizar inhibidores del citoesqueleto de actina o de la adhesión intercelular [60, 77].

Por otro lado, la proteína no esencial del VIH-1 Nef, que aumenta la capacidad infectiva del virus, es capaz de regular la dinámica del citoesqueleto de Actina. Nef se une al complejo multiproteico de PAK-2 activando a PAK-2, Rac y Vav-1 (activador de Rac) [78-80]. Asimismo, una región de la glicoproteína viral gp41 es capaz de unirse a p115-RhoGEF e inhibir Rho [81] desplazando el equilibrio de las Rho-GTPasas hacia Rac. Así, el virus sería capaz de inducir la formación de lamelipodios y filopodios e inhibir la formación de fibras de estrés [82].

Igualmente, la densidad del receptor y co-receptores del VIH-1 en membrana, así como la fluidez de ésta, influyen decisivamente en la entrada de las partículas virales libres [74, 83].

La mayoría de las formas de transmisión del VIH-1 conllevan un íntimo contacto entre las membranas plasmáticas de dos células o la membrana plasmática de la célula diana y la envuelta viral. Por tanto, la estructura de la membrana y su conexión con el citoesqueleto de actina, modulan la eficacia de transmisión del virus. De este modo, proteínas como las tetraspaninas, moléculas asociadas a ellas (EWI-2), proteínas adaptadoras (Sinténina-1) y conectoras con el citoesqueleto de actina ( $\alpha$ -Actinina y Drebrina) pueden ser importantes en la transmisión del VIH-1 (**Figura 10**).



**Figura 10.** Esquema mostrando las proteínas estudiadas en la memoria y sus asociaciones en la membrana plasmática. Se pueden observar las interacciones entre CD81-EWI-2 y CD81-CD4, así como las de EWI-2 (a través de las ERMs),  $\alpha$ -Actinina y Drebrina con los filamentos de Actina.

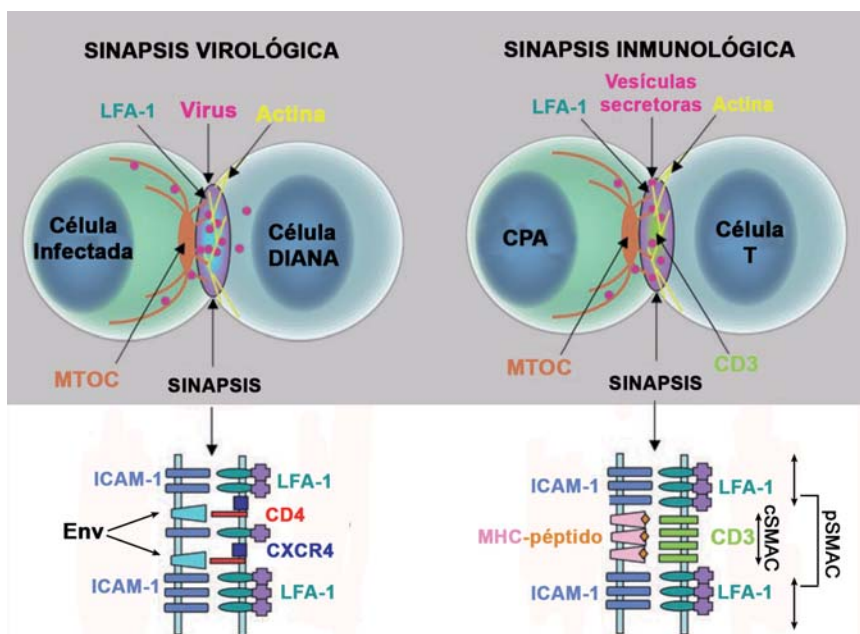


#### 4. ANALOGÍAS ENTRE LA SINAPSIS VIROLÓGICA Y LA SINAPSIS INMUNE

Para que ocurra la respuesta inmune adquirida es esencial el reconocimiento entre el linfocito T virgen y la célula presentadora de antígeno (CPA). Este reconocimiento específico conlleva múltiples interacciones entre proteínas de las membranas de los dos tipos celulares que se organizan en lo que se conoce como sinapsis inmunológica (SI) [84]. Una vez sucedido el reconocimiento T-CPA, la célula T se activa y diferencia hacia alguno de los tipos de células T efectoras o colaboradoras para iniciar la respuesta inmune adquirida.

De este modo, las moléculas implicadas en la sinapsis inmune se distribuyen específicamente en dos zonas concéntricas en la interfaz T-CPA: una central (cSMAC o complejo supramolecular de activación central) donde se agrupan el receptor de las células T (TCR) y el complejo péptido-MHC de la célula presentadora, y un anillo periférico de adhesión denominado pSMAC (complejo supramolecular de activación periférico) donde se concentran el par LFA-1/ICAM-1 y que está anclado al citoesqueleto de actina [85, 86] (**Figura 11**).

Cuando se caracterizó la transmisión viral de célula a célula, se observó que ésta tenía una gran homología estructural y molecular con la ya conocida sinapsis inmune, por lo que al contacto íntimo entre una célula infectada y una no infectada en el que se produce la transmisión del virus se denominó sinapsis virológica (SV) [57]. En la SV, el equivalente al cSMAC, concentraría la glicoproteína viral y CD4-CXCR4/CCR5, y, alrededor, en el equivalente al pSMAC, estarían las moléculas de adhesión como las reclutadas en la sinapsis inmune [87]. Así muchas de las moléculas importantes para la SI están también potencialmente implicadas en la SV, como es el caso de las proteínas analizadas en este estudio.



**Figura 11.** Esquema comparativo de la sinapsis inmune y la sinapsis viral. Modificado a partir de Piguet et al. 2004 (MTOC es la abreviatura de Centro Organizador de Microtúbulos).



## OBJETIVOS





## OBJETIVOS

- Estudio del papel de las tetraspaninas, organizadores de microdominios proteicos en la membrana celular, en la entrada del virus VIH-1 en células T CD4<sup>+</sup> y en la formación de sincitios inducida por la envuelta viral.
- Estudio del papel de EWI-2, receptor asociado a las tetraspaninas CD9 y CD81, en la entrada del VIH-1 y la formación de sincitios inducida por la envuelta viral.
- Estudio del papel de proteínas intracelulares conectadas a los microdominios enriquecidos en tetraspaninas, al receptor o al co-receptor del VIH-1 en la entrada viral y la formación de sincitios:
  - $\alpha$ -Actinina
  - Sintenina-1
  - Drebrina



## **MATERIALES Y MÉTODOS**







## MATERIALES Y MÉTODOS

### Células y cultivos celulares

Las líneas celulares que se han usado para este trabajo son:

- HeLa P5, clon estable derivado de la línea epitelial humana HeLa que expresa CD4, CXCR4 y CCR5-GFP además de portar un gen LacZ reportero controlado por el promotor LTR del VIH-1. Se cultivó en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 500 µg/ml de G418 y 500 µg/ml de higromicina B.
- HeLa 243 y HeLa ADA, clones derivados de la línea HeLa que co-expresan el transactivador de VIH-1 Tat y la envuelta T-trópica 243 o M-trópica ADA, respectivamente (proporcionadas por Dr. M. Alizon (Hôpital Cochin, Paris, France). Se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FBS y 1 µM de Metotrexato.
- CEM 1.3, línea humana de linfoblastos T. Se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS.
- Jurkat HxBc2, clon estable derivado de la línea Jurkat (humana linfoblástica T) que expresa en su membrana plasmática la envuelta T-trópica HxBc2 del VIH-1 (clon proporcionado por the *National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program*). Este clon se cultiva en RPMI con 10%FBS junto con antibióticos de selección G418 (200 µg/ml), higromicina B (200 µg/ml) y tetraciclina (1 µM). La envuelta HxBc2 se expresa cuando se retira del medio la tetraciclina (promotor Tet-off) alcanzando el máximo nivel de expresión a día 3, y manteniéndose hasta el día 6.
- Jurkat J77, clon derivado de la línea Jurkat que posee el TCR Vβ<sub>8</sub> capaz de reconocer al superantígeno E presentado en el contexto del MHC-II. Se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS).
- Raji, clon de linfoblastos B MHC-II<sup>+</sup>. Se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS).
- Linfoblastos primarios humanos. Se obtuvieron a partir de linfocitos de sangre periférica (PBL, *Peripheral Blood Lymphocytes*) de donantes sanos voluntarios por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque ( $\rho=1.077$  g/ml). Se separaron los anillos de células mononucleares (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), se lavaron cuatro veces con suero salino y se resuspendieron en medio RPMI-1640 con 10% FBS. Después, los monocitos se retiraron por adhesión a plástico a 37°C durante media hora. Los PBLs resultantes se cultivaron dos días en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS en presencia de PHA (5 µg/ml) y 50 U/ml de IL-2 humana recombinante (obtenida del *National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program*) para su activación. Tras 48 h, se retiró la PHA y los linfoblastos se mantuvieron con IL-2 durante tres días más hasta su utilización en los experimentos.

## Reactivos

- Sondas fluorescentes intracelulares. Las células fueron marcadas con sondas de Molecular Probes (Invitrogen) para los ensayos de citometría de flujo e inmunofluorescencia. Estas sondas poseen cadenas alifáticas que posibilitan que entren en la célula atravesando la membrana plasmática. Una vez en el citosol, las esterasas celulares hidrolizan estas cadenas alifáticas de forma que la sonda no puede atravesar de nuevo la membrana y salir de la célula. El marcaje se realizó en ausencia de suero (ya que éste contiene esterasas) durante 30 min a 37°C. La sonda no internalizada se eliminó lavando las células marcadas dos veces con medio salino y una vez con medio completo. Las sondas utilizadas son:
  - Calcein-AM, que emite fluorescencia verde ( $\lambda_{\text{emisión}}=515$  nm).
  - CellTrackerOrange5-((and-6)-(4-chloromethyl-benzoyl-amino)tetramethylrhodamine)-mixed isomers (CMTMR), que emite en rojo ( $\lambda_{\text{emisión}}=565$  nm).
  - Cell Tracker Blue 7-amino-4-chloromethylcoumarin (CMAC), cuya fluorescencia es azul ( $\lambda_{\text{emisión}}=466$  nm).
- Péptido inhibidor de fusión T20 de Roche Diagnostics. Este péptido se asocia a las  $\alpha$ -hélices del péptido de fusión de la gp41 del VIH-1, impidiendo el cambio conformacional que se precisa para la fusión de membranas durante la entrada del virus en la célula.
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) producto químico fluorescente que se une al ADN marcando los núcleos celulares.
- BIRT-377, antagonista de LFA-1 que evita su cambio conformacional al estado de alta afinidad, y por tanto su interacción con ICAM-1. Su fórmula química es (R)-5-(4-bromobenzyl)-3-(3,5-dichlorophenyl)-1,5- dimethylimidazolidine-2,4-dione).
- Faloidina acoplada a Alexa 488/568/647 (Invitrogen). Toxina capaz de unirse a F-Actina con alta afinidad. Se utilizó diluida 1:200 para ver el patrón de F-Actina por inmunofluorescencia.
- Los anticuerpos utilizados para este trabajo se presentan en la siguiente tabla (Tabla I):

Tabla I. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Generado en	Técnicas **	Antígeno	Observaciones y comentarios
HP2/6*	Ratón	IF FS WB (2 $\mu\text{g/ml}$ )	CD4	Bloquea la interacción de gp120 con CD4 (10 $\mu\text{g/ml}$ )
T4*	Ratón	IF FACS	CD4	
Anti-CD4v4-PE/FITC	Ratón	IF (1:50)	CD4	Reconoce CD4 unido o no a gp120. (Becton-Dickinson)
Anti-CXCR4-biotinilado	Ratón	IF (1:25) FACS(1:50)	CXCR4	(Becton-Dickinson)
Anti-CCR5-biotinilado	Ratón	IF (1:25) FACS(1:50)	CCR5	(Becton-Dickinson)

Anticuerpo	Generado en	Técnicas **	Antígeno	Observaciones y comentarios
VJ1/20 *	Ratón	IF FS FACS	CD9	
GR2110	Ratón	FS (5 µg/ml)	CD9	Dr. F. Garrido (Hospital Virgen de las Nieves, Granada)
5A6	Ratón	IF(1:1000) FS (5 µg/ml) WB(1:1000)	CD81	(Santa Cruz Biotechnology)
I33.22	Ratón (ascites)	IF(1:1000) FS (5 µg/ml) FACS(1:1000)	CD81	Dr. R. Vilella (Hospital Clinic, Barcelona)
Lia 1/1.1*	Ratón	IF FS	CD151	
VJ1/9*	Ratón	IF FS	CD147	
T3b*	Ratón	IF	CD3	
OKT3	Ratón	FS (0,5 µg/ml) Inf (0,5 µg/ml)	CD3	(Biolegend)
TP1/55*	Ratón	FACS	CD69	
D3/9*	Ratón	FS	CD45	
Anti-Sintenina-1	Conejo	IF(1:100) WB(1:100)	Sintenina-1	(Synaptic Systems)
M2F6	Ratón	IF(1:100) WB(1:100)	Drebrina	(MBL)
Anti-Drebrin	Conejo	IF(1:100) WB(1:100)	Drebrina	(Sigma)
Anti- $\alpha$ -Actinina	Conejo	IF(1:1000) WB(1:1000)	$\alpha$ -Actinina	Reconoce todas las isoformas
Anti-Tubulina	Ratón	WB(1:1000) IF (1:1000)	$\alpha$ -Tubulina	(Sigma)
Anti-Miosina IIA	Conejo	IF(1:300)	Miosina IIA	(Covance)
TP1/25 *	Ratón	IF	ICAM-3	
TP1/40*	Ratón	FACS	LFA-1	
X63*	Ratón	FACS		Usado como control negativo de tinción
Anti-Vimentina	Ratón	WB(1:1000)	Vimentina	(Sigma)
Anti-PLC $\gamma$	Conejo	WB(1:1000)	PLC $\gamma$	(Cell Signaling Technology)

Anticuerpo	Generado en	Técnicas **	Antígeno	Observaciones y comentarios
Anti-P-PLC $\gamma$	Conejo	WB(1:1000)	P-PLC $\gamma$	(Cell Signaling Technology)
Anti-Vav-1	Conejo	WB(2 $\mu$ g/ml)	Vav-1	(Millipore)
Anti-P-Vav-1	Conejo	WB(2 $\mu$ g/ml)	P-Vav-1	X. Bustelo (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca)
Anti-ZAP-70	Conejo	WB(1:1000)	ZAP-70	(Abcam)
Anti-P-ZAP-70	Conejo	WB(1:1000)	P-ZAP-70	(Abcam)
Anti-Src	Conejo	WB(1:1000)	Src	(Santa Cruz Biotechnology)
Anti-P-Src	Conejo	WB(1:1000)	P-Src	(Santa Cruz Biotechnology)
Anti-ERK	Ratón	WB(1:500)	ERK1/2	(Millipore)
Anti-P-ERK	Conejo	WB(1:1000)	P-ERK1/2	(Cell Signaling Technology)
<b>SECUNDARIOS</b>				
GAM-488/568	Cabra	IF (1:100)	Ig de ratón	(Invitrogen)
GAR-488/568	Cabra	IF (1:1000)	Ig de conejo	(Invitrogen)
GAM-HRP	Cabra	WB (1:2000)	Ig de ratón	(Pierce)
GAR-HRP	Cabra	WB (1:10000)	Ig de conejo	(Pierce)
Estreptavidina-488/PE		FACS (1:500)	Biotina	(Invitrogen)
XL (GAM)	Cabra	Inf (20 $\mu$ g/ml)	IgGs de ratón	(Sigma)

\* Anticuerpos del laboratorio obtenidos como sobrenadantes del cultivo de hibridomas. Se usaron sin diluir para FACS e IF, y purificados por cromatografía de afinidad a 1-10  $\mu$ g/ml en los ensayos de formación de sincitios.

\*\* Técnicas: FACS (citometría de flujo), FS (Formación de sincitios), IF (Inmunofluorescencia), WB (*Western-blot*) e Inf (Infección).

La procedencia de los anticuerpos se indica entre paréntesis en el apartado de Observaciones.

GAM: Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón

GAR: Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo

HRP: Peroxidasa de rábano picante

XL: Entrecruzador

### Construcciones de ADN y sobreexpresión

Los plásmidos CD9-GFP y CD81-GFP fueron construidos por la Dra. María Mittelbrunn a partir de los ADNc de ambas tetraspaninas en el vector peGFP-N1 [25]. Para obtener las versiones truncadas en la región citoplasmática C-terminal de CD81 y EWI-2 se amplificaron los insertos

por PCR a partir de los vectores originales usando oligos diseñados para retirar la secuencia correspondiente (ver Tabla II). Los productos amplificados se insertaron en el vector TopoTA (Invitrogen) y después, se subclonaron en el pAcGFP-N1 (Invitrogen). La construcción EWI-2-GFP se realizó del mismo modo utilizando oligos que reconocían la secuencia inicial y final del ADNc original sin el codón stop (ver Tabla II).

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de los distintos plásmidos.

Construcción	Secuencias 5'-3'	Vector
CD81ΔCyt-GFP	CTCGAGATGGGAGTGGAGGGCTGC AAGCTTACAGCACAGCACCATGCT	pAcGFP-N1
EWI-2-GFP	CGAGATCTCATGGGCGCCCTCAGGC CGAAGCTTCCGTTTTTCGAAGCCTC	pAcGFP-N1
EWIΔCyt -GFP	CGAGATCTCATGGGCGCCCTCAGGC CGAAGCTTGCAGCAAGTGATGGTACCAAG	pAcGFP-N1

Se muestra en azul las secuencias consenso de las enzimas de restricción usadas (Xho-I y Hind-III) y en rojo el codón de inicio.

Las construcciones de  $\alpha$ -Actinina-GFP y ActininaABD-GFP fueron donadas por los Dres. Jonathan Jones (Northwestern University, Chicago) y Maki Murata-Hori (National University of Singapore, Singapur), respectivamente. Los plásmidos Drebrina-GFP y Drebrina1-366-GFP fueron donados por el Dr. T. Shirao (Gunma University, Japan). Las construcciones de Syntenina-1 acopladas a GFP o a GST fueron cedidas por el Dr. Francisco Lozano (IDIBAPS, Barcelona).

### Generación de los stocks virales y pseudopartículas

Las partículas virales infecciosas utilizadas provenían de aislados de la cepa T trópica NL4.3 producidos en el laboratorio de la Dra. Muñoz-Fernández (Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid). Los stocks virales se prepararon expandiendo los aislados virales en la línea celular MT-2 transformada con el virus HTLV-1. Los títulos virales se confirmaron midiendo la proteína viral p24 en el sobrenadante de los cultivos mediante ELISA (INNOTEST HIV-1 Ag mAb; Innogenetic). Para asegurar la pureza de los stocks virales, las alícuotas se filtraron utilizando filtros de 0.22  $\mu$ m antes de su uso.

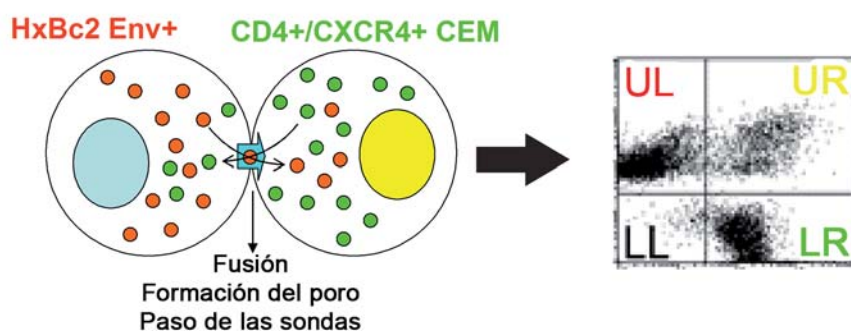
Las partículas pseudovirales fluorescentes fueron producidas por la Dra. N. Izquierdo Users del laboratorio de J. Martínez Picado (IrsiCaixa, Barcelona). Para generarlas se co-transfectaron células 293T con los plásmidos que codifican para *Gag-eGFP/Cherry* y *Env* (X4-trópica). Se recogió el sobrenadante a 48 h y se congeló a -80°C.

## Ensayos de formación de sincitios

### Modelo de formación de sincitios con líneas celulares linfoides:

Para cuantificar la capacidad de fusión celular inducida por la envuelta viral se puso a punto un análisis por citometría de flujo. Las células diana  $CD4/CXCR4^+$ , normalmente CEM 1.3, se marcaron con Calcein-AM y se co-cultivaron en una relación 1:1 con células  $Env^+$  (Jurkat HxBc2) marcadas con CMTMR. Tras 7 ó 16 h las células del cocultivo se tripsinizaron para deshacer posibles agregados celulares y se analizaron en un citómetro de flujo. Las células fusionadas formando sincitios presentaban doble fluorescencia verde y roja, además de un mayor tamaño/complejidad. El porcentaje de células fusionadas se calculó como  $100 \times UR/UL$ , donde UR es el porcentaje de células con doble fluorescencia y UL es el porcentaje de células marcadas con la sonda roja. Como control negativo se utilizaron el anticuerpo bloqueante anti-CD4 HP2/6 o el péptido inhibidor de fusión T20 (30 nM).

Para observar la localización de las proteínas durante la formación de sincitios se co-cultivaron las células 2-3 h y se sembraron en cristales recubiertos con poli-L-Lisina (50  $\mu\text{g/ml}$ ; Sigma).

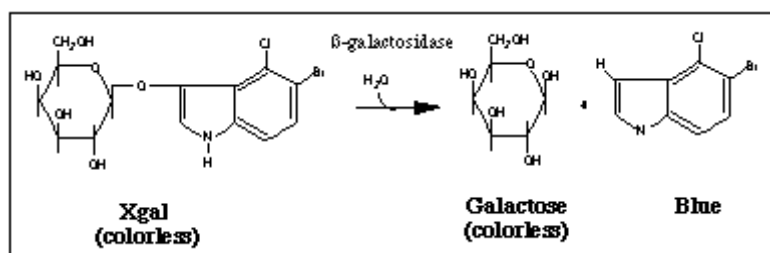


**Figura 12. Modelo de cuantificación de sincitios por citometría de flujo.**

### Modelo de formación de sincitios con líneas derivadas de HeLa:

Para cuantificar la formación de sincitios inducida por la envuelta viral en el sistema HeLa se midió la actividad galactosidasa de los co-cultivos celulares entre células HeLa 243 o HeLa ADA y la línea HeLa P5 ( $CD4^+/CXCR4^+/CCR5^+$ ) en pocillos P96 durante 16 h. Cuando la envuelta viral de las HeLa 243 o ADA interacciona con el  $CD4/CXCR4$  o el  $CD4/CCR5$  (respectivamente) de la línea HeLa P5, se produce la fusión entre las membranas de ambas células y la formación de un sincitio. Estos sincitios presentan Tat en el citoplasma y su promotor LTR controlando el gen reportero LacZ, en uno de los núcleos (el procedente de la célula diana HeLa P5). Tat transactiva el LTR y como consecuencia se produce la enzima beta-galactosidasa. Las células con actividad beta-galactosidasa (sincitios) pueden visualizarse *in situ* fijando con PBS 0.5% glutaraldehído e incubando con un análogo incoloro de la lactosa, X- galactosidase substrate

5-bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-Gal), que al ser hidrolizado genera un producto azul.



Para cuantificar la formación de sincitios total en cada pocillo, las células se lisaron y se midió la actividad enzimática beta-galactosidasa acoplando esta reacción enzimática a la de la luciferasa mediante el uso del kit de quimioluminiscencia de Roche Diagnostics. La quimioluminiscencia de los lisados se midió en un luminómetro de placa.

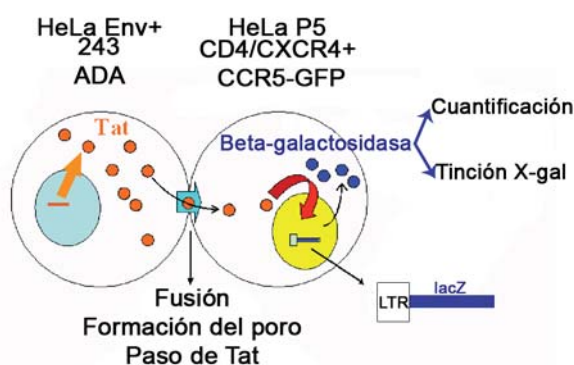


Figura 13. Modelo de cuantificación de sincitios por actividad

### Marcaje de moléculas por citometría de flujo

Las células se fijaron 10 min con 2% para-formaldehído y se incubaron durante 20 min con los anticuerpos primarios necesarios en cada caso (ver Tabla I). Tras un lavado con PBS, las células se incubaron con anticuerpos secundarios o estreptavidina según fuese conveniente (ver Tabla I). Finalmente las células se lavaron y se analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, CA). En los ensayos se han adquirido 10.000 eventos por condición que se han analizado utilizando el programa CellQuestPro de Becton-Dickinson.

### Silenciamiento específico de la expresión de proteínas

El silenciamiento de las diversas proteínas se llevó a cabo transfectando las células diana con dúplex de ARN interferentes de pequeño tamaño (*siRNA*) específicos para cada molécula. Las células linfoides se transfectaron por electroporación y las HeLa mediante liposomas (Oligofectamina; Invitrogen). Como control negativo se utilizó un dúplex de ARN diseñado por Eurogentec que no aparea con ningún ARNm eucariota.



Tabla III. Oligonucleótidos de interferencia utilizados.

Diana de interferencia	Secuencia 5'-3'	Máx. interferencia (Tipo celular)
CD81	CAATTTGTGTCCCTCGGGC	24 h (CEM 1.3) 3 días (HeLa P5)
CD81	CACCTTCTATGTAGGCATC	24 h (CEM 1.3) 3 días (HeLa P5)
CD9	ACCTTCACCGTGAAGTCCT	24 h (CEM 1.3) 3 días (HeLa P5)
CD9	GAGCATCTTCGAGCAAGAAA	24 h (CEM 1.3) 3 días (HeLa P5)
Sintenina-1	J-008270-08 Dharmacon	48 h (CEM 1.3) 24-48 h (J77)
Drebrina	1627 Dharmacon	24-48 h (CEM 1.3) 24-48 h (J77)
$\alpha$ -Actinina-1	CACCAUGCAUGCCAUGCAA	24-48 h (CEM 1.3)
$\alpha$ -Actinina-4	GCAGCAGCGCAAGACCUUC	24-48 h (CEM 1.3)

La reducción de la expresión de las proteínas interferidas se cuantificó a distintos tiempos mediante citometría de flujo, para aquellas proteínas que se expresaban en la membrana celular y/o por western blot de lisados totales. De este modo se estableció el tiempo de máxima interferencia para cada molécula, oligonucleótido y tipo celular (ver Tabla III).

En el caso de la interferencia de tetraspaninas, para enriquecer la población de células con baja expresión de CD9, CD81 o CD151, las células interferidas se seleccionaron negativamente por incubación durante 5 min a 4°C con microesferas magnéticas cubiertas con anti-CD81 mAb (5A6), anti-CD9 (VJ1/20) o anti-CD151 (Lia 1/1.1) (Dynabeads M450 goat anti-mouse IgG; Dynal Biotech). Las células obtenidas tras este paso selectivo se analizaron nuevamente por citometría de flujo para la expresión de CD9, CD81, CD4, CXCR4 y CCR5.

### Transfección de ADN

La transfección transitoria de las células CEM 1.3 o J77 se realizó por electroporación de  $1-2 \times 10^7$  células en un electroporador con cubetas de 0.4 cm (240 V, 950  $\mu$ F, high capacitance).

La transfección transitoria de las células HeLa se realizó por liposomas siguiendo las instrucciones del fabricante (Megafectamina; Invitrogen).

### Formación de conjugados T-CPA

Las células presentadoras de antígeno (CPA) se incubaron con 1  $\mu$ g/ml de superantígeno E (SEE) (obtenido de Toxin Technology) durante 30 min a 37°C. Se lavó el exceso de SEE no



unido a MHC por centrifugación en medio completo. Las CPA cargadas con SEE se pusieron en contacto con células T J77 mediante un pulso de 30 s a 800 rpm y se cultivaron a 37°C durante distintos tiempos (para la cinética de fosforilación 1 y 10 min; para las inmunofluorescencias 15 min). Para las cinéticas de fosforilación, dado que lo que nos interesaba era la fosforilación de la célula T, se utilizó una relación de CPA:T de 1:6. Para el resto de ensayos se utilizó una relación de CPA:T de 1:1.

### **Inmunofluorescencia**

Las células se sembraron sobre cristales previamente recubiertos con poli-L-Lisina durante 30 min a 37°C y se fijaron con TBS 3% para-formaldehído durante 5 min. Después de un lavado con TBS, se permeabilizaron (0.1% Tritón X-100 en TBS, 10 min) en los casos necesarios, se bloquearon con TBS 1% BSA (1 h a 37°C), y se incubaron con los anticuerpos primarios convenientes (ver Tabla I) durante 30 min a 37°C. Los cristales se lavaron de nuevo con TBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados durante 30 min a 37°C (ver Tabla I). En los casos de dobles tinciones con posible reacción cruzada entre anticuerpos secundarios (secundario anti-ratón seguido de un primario de ratón biotinilado), se realizó una incubación previa a la segunda tinción de 1 h a 37°C con suero de ratón (diluido 1:100). Las preparaciones se lavaron finalmente con TBS y se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje (mowiol).

En los cristales de co-cultivos celulares, las células Env<sup>+</sup> o las presentadoras de antígeno se marcaron previamente con sonda intracelular azul (CMAC).

Las muestras se visualizaron posteriormente usando un microscopio de fluorescencia Leica DMR o un microscopio confocal Leica TCS-SP1/5.

Las imágenes con código de color para la intensidad de fluorescencia, así como los histogramas de intensidad de fluorescencia a lo largo de una línea se obtuvieron usando el software de Leica LAS-AF y el programa ImageJ 1.42 (<http://rsb.info.nih.gov/ij>), respectivamente. Las reconstrucciones 3D y en el eje Z se realizaron con el *plug-in Stacks-Z function (ImageJ 3D viewer)*.

### **Ensayos de video-microscopía confocal**

Para realizar los vídeos de formación de sincitios las células diana se sembraron en cristales recubiertos con poli-L-Lisina insertados en cámaras especiales que se introdujeron en un incubador de microscopía que mantiene las células a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez elegido el campo de interés y las condiciones de adquisición con el microscopio confocal se añadieron las células Env<sup>+</sup> marcadas con CMTMR esperando a que se depositasen junto a las células diana

y comenzasen a interactuar. Se adquirieron imágenes por un período de 2 h grabando seis secciones ópticas cada 15 s.

### Western blotting

Las células se lisaron con 1% Nonidet P-40 en PBS con inhibidores de proteasas (Complete, Roche) durante 30 min a 4°C (50 µl de tampón de lisis por  $1 \times 10^6$  células). Después los lisados se clarificaron por centrifugación a 11000 rpm 10 min a 4°C. Las muestras se hirvieron durante 5 min con el tampón de carga Laemmli. El contenido de cada muestra (20-30 µl) se resolvió por electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras o no (los anticuerpos anti-tetraspaninas sólo detectan la proteína en condiciones no reductoras), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot; BioRad) y se inmunodetectaron las proteínas de interés. Como control de carga de las muestras se usaron proteínas del citoesqueleto como vimentina y tubulina. Para las cinéticas de fosforilación se añadieron inhibidores de fosfatasa al tampón de lisis (NaF 10 mM, β-Glicerofosfato sódico 5 mM, Pirofosfato sódico 1 mM, y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM).

### Ensayos de infección viral

Dado que nuestro interés se centraba en la entrada del virus en la célula diana, los experimentos de infección se diseñaron para amplificar las diferencias que hubiera en este paso inicial. Las células se incubaron durante tan sólo 2 h (línea CEM 1.3 y linfoblastos primarios) o 5 h (HeLa P5) con las partículas virales, lavando exhaustivamente después para retirar toda partícula viral libre en el medio. Posteriormente se dejó transcurrir la infección durante 3 y 6 días. Así, la cantidad de virus detectada a días 3 y 6 resulta de la diferente capacidad de entrada de los virus en las células durante el corto período de incubación inicial. Las células linfoides se infectaron con el equivalente viral correspondiente a 100 ng de p24 viral por  $1 \times 10^6$  de células, y las HeLa P5 con 500 ng de p24 viral por  $1 \times 10^6$  de células.

La entrada viral se midió lisando y cuantificando la actividad β-galactosidasa a día 2 en las células HeLa P5 infectadas. En el caso de las células linfoides se cuantificó la producción viral midiendo la cantidad de proteína viral p24 en el medio de cultivo a días 3 y 6 usando la técnica de ELISA (INNOTEST HIV-1 Ag mAb; Innogenetic).

En algunos casos las células fueron preincubadas con anticuerpos para bloquear la infección (HP2/6; 10 µg/ml), para ver el efecto del propio anticuerpo (5A6; 5 µg/ml) o para activar la célula T (OKT3; 0.5 µg/ml).

### Ensayos de *capping* (reclutamiento de moléculas por la envuelta viral)

Las células se incubaron 30 min a 4, 16 ó 37°C con una cantidad de virus equivalente a 200-500 ng de p24 por  $1 \times 10^6$  células o cantidades equivalentes de VLPs y posteriormente se adhirieron a

cristales previamente recubiertos con poli-L-Lisina durante otros 30 min a 4, 16 ó 37°C. Tras este tiempo, las células se fijaron con TBS 2% para-formaldehído y se procedió a la inmunotinción utilizando el anti-CD4v4 para la detección de todas las moléculas de CD4 independientemente de su unión a gp120.

### **Ensayos de *pull-down***

Para los ensayos de *pull-down* se utilizaron  $1 \times 10^7$  de células J77 ó  $3 \times 10^7$  linfoblastos T por condición. Las células se lavaron dos veces con TBS a 4°C y se lisaron en 1% Nonidet P-40 en TBS durante 15 min a 4°C. Los lisados se centrifugaron 5 min a 15.000 rpm y 4°C. Se recogió una alícuota de 50 µl de lisado y se guardó a -20°C.

En el caso de CXCR4 y Sintenina-1 se produjeron las construcciones GST y se acoplaron a una matriz de sefarosa (GST sola, CXCR4Cyt-GST o Sintenina-HA/Myc-GST). En el caso de las regiones citoplasmáticas de CD81 y EWI-2, se utilizaron péptidos de estas regiones biotinilados (15 µmoles para 40 µl de estreptavidina-sefarosa por condición).

Se incubaron los lisados con sefarosa-GST/estreptavidina durante 2 h en rotación a 4°C para retirar interacciones inespecíficas. Este paso se repite de nuevo y por último, el sobrenadante resultante se incubó 16 h a 4°C y en rotación con la sefarosa acoplada a CXCR4Cyt-GST, Sintenina-HA/Myc-GST o la sefarosa-estreptavidina acoplada a los péptidos biotinilados. Posteriormente la sefarosa unida a los complejos proteicos de interés se lavó seis veces con 0.1% Nonidet P-40 en TBS. Finalmente, las muestras de sefarosa se resuspendieron en el tampón de carga Laemmli y se hirvieron durante 5 min. 20-30 µl de cada muestra se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot; BioRad) y se inmunodetectaron las proteínas de interés o se analizaron por espectrometría de masas.

### **Análisis proteómico por espectrometría de masas**

Las proteínas de los ensayos de *pull-down* se concentraron en un gel SDS-PAGE concentrador y se digirieron con tripsina. Los péptidos resultantes de la digestión se analizaron en el laboratorio del Dr. Jesús Vázquez (CBMSO; Madrid) mediante espectrometría de masas. Las proteínas fueron identificadas usando el programa SEQUEST y comparándolas con la base de datos de proteínas humanas del *Swissprot*. El análisis estadístico y la determinación del ratio de errores en la identificación de péptidos se realizó como se ha descrito previamente [88] y corregidos con el método de cálculo FDR [89]. El número de *scans* y péptidos obtenidos para cada proteína se correlaciona con la cantidad de proteína asociada al péptido o construcción-GST utilizados. Como controles de especificidad se usaron GSTs o péptidos biotinilados de otras proteínas (CD147 y CD151) además de GST sola.



## RESULTADOS





## RESULTADOS

### 1. ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE SINCITIOS INDUCIDA POR LA ENVUELTA VIRAL DE VIH-1

La formación de sincitios es una de las formas de transmisión del VIH-1 gracias a la cual el virus es capaz de infectar células diana sin exponerse a la respuesta inmune humoral. Este proceso requiere de una gran proximidad celular, por lo que podría ser especialmente importante en los órganos linfoides de individuos enfermos.

Para estudiar este proceso co-cultivamos dos líneas celulares T: una portadora de la envuelta viral T-trópica (Jurkat HxBc2 Env<sup>+</sup>; en el vídeo marcadas en rojo con la sonda CMTMR) y otra receptora CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> (Jurkat J77). Para poder observar eventos de fusión celular, fue necesaria una alta densidad de co-cultivo. Como se aprecia por microscopía confocal, el proceso es cooperativo y transcurre rápidamente una vez establecido un contacto productivo (*video 1*).

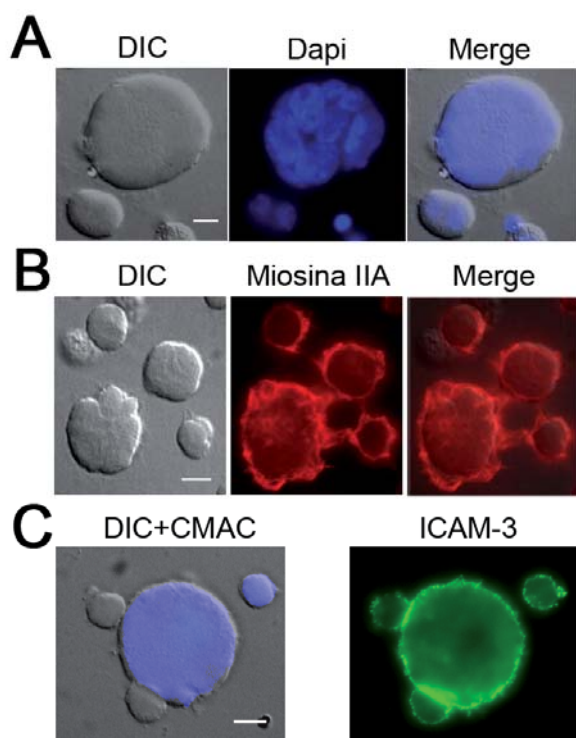
Para cuantificar este proceso se pusieron a punto dos técnicas utilizando distintos tipos celulares: una técnica usando líneas celulares T basada en citometría de flujo (ver Materiales y Métodos) y otra en clones de células HeLa basada en la activación del gen reportero *LacZ* (ver Materiales y Métodos). El modelo HeLa, aunque menos fisiológico, permite estudiar la fusión celular inducida por una envuelta de tropismo-T (CXCR4) o la inducida por una envuelta de tropismo-M (CCR5) ya que las células diana expresan los dos receptores de quimiocinas y existe un clon HeLa expresando cada una de las envueltas (clones 243 y ADA, ver Materiales y Métodos). Se realizó un video confocal en el sistema HeLa con envuelta M-trópica y se observó una gran semejanza con respecto al sistema linfóide con envuelta T-trópica (*video 2*).

Se realizaron también múltiples marcajes por inmunofluorescencia de proteínas transmembrana y citoesqueléticas fijando a distintos tiempos. En la **Figura 14** se muestra una tinción con Dapi (**Figura 14A**), que colorea los núcleos que existen en un sincitio, y un ejemplo de una proteína citoesquelética (Miosina II-A, **Figura 14B**) y una transmembrana (ICAM-3, **Figura 14C**) durante la formación de sincitios inducida por la envuelta viral.

### 2. PAPEL DE LAS TETRASPANINAS EN LA INFECCIÓN DE LINFOCITOS T POR VIH-1

#### 2.1 Las tetraspaninas se localizan en las zonas de contacto de la envuelta viral con la célula diana

Las tetraspaninas constituían un grupo interesante de proteínas dada su capacidad organizativa en la membrana plasmática, y su implicación en algunos procesos virales. CD81 además, se había asociado con CD4, receptor del virus [27].



**Figura 14**

**Estudio de la formación de sincitios entre células Jurkat J77 y Jurkat Env<sup>+</sup> mediante microscopía.**

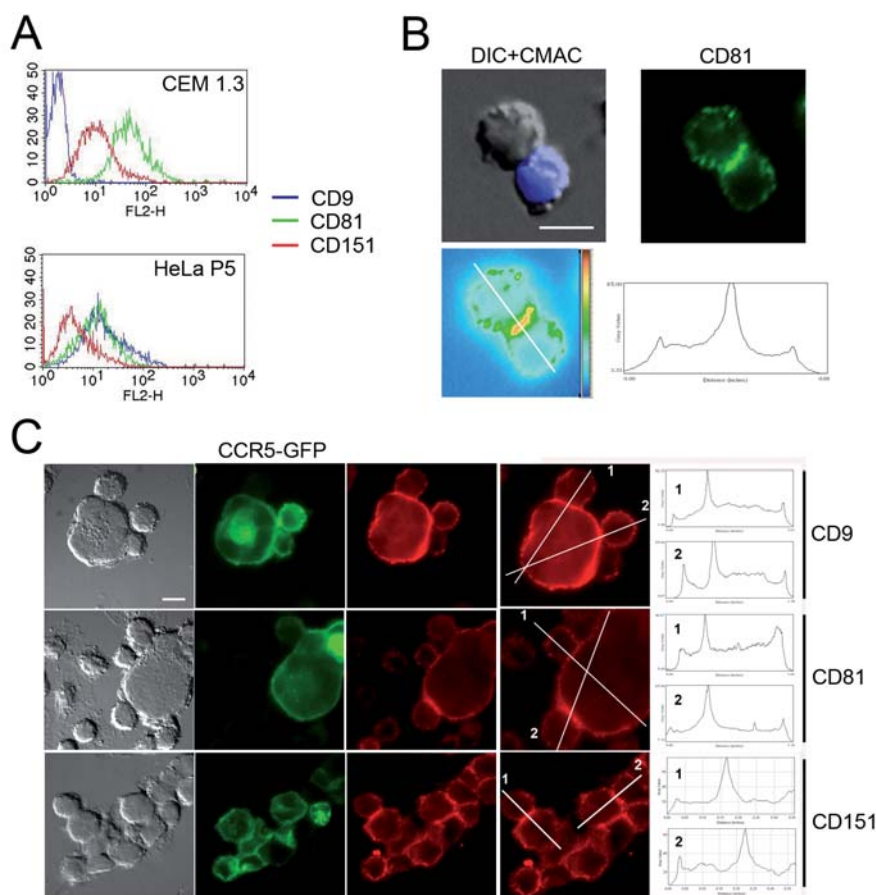
Las células se incubaron durante 16 h a 37°C y se sembraron en cristales con poli-L-Lisina para las posteriores tinciones. **A)** Tinción con Dapi que muestra la naturaleza multinucleada de varios sincitios. **B)** Tinción de la proteína citoesquelética Miosina no muscular IIA. Se percibe el dinamismo y la movilidad que mantienen los sincitios, emitiendo proyecciones membranosas para contactar con otras células y sincitios. **C)** Marcaje de la proteína de adhesión celular ICAM-3. Esta proteína se acumula en los contactos entre el sincitio y las células que se están fusionando con él. Las barras blancas equivalen a 10 μm.

Para comenzar a indagar en el posible papel de estas proteínas en la entrada de VIH-1 se cuantificó por citometría de flujo la expresión de distintos miembros de esta familia de proteínas en la membrana plasmática de líneas celulares T y HeLa. La mayoría de las líneas T no expresaban CD9, poseían bajos niveles de CD151 y CD63 (la mayoría de CD63 se expresa en compartimentos intracelulares en linfocitos T), y expresaban cantidades apreciables de CD81 (**Figura 15A**; panel superior). El clon HeLa P5 expresaba altos niveles de CD9 y CD81, y niveles medios de CD151 (**Figura 15A**, panel inferior).

A continuación quisimos visualizar la localización subcelular de estas tetraspaninas en células no infectadas en contacto con células Env<sup>+</sup>. En ambos sistemas celulares las tetraspaninas se localizaban a lo largo de toda la membrana en las células no infectadas y se reclutaban hacia los contactos intercelulares junto con CD4 y CXCR4/CCR5. (**Figura 15B y C**). El análisis de la intensidad de fluorescencia a lo largo de las líneas dibujadas sobre las imágenes resaltaba que la intensidad de fluorescencia en los contactos celulares es mayor que la suma de las intensidades de fluorescencia de cada membrana fuera del contacto, por tanto, las tetraspaninas se estaban congregando de forma activa en los contactos.

En dichos contactos intercelulares, ambas células (diana y Env<sup>+</sup>) expresan tetraspaninas, por lo que no se puede diferenciar las moléculas que aporta cada célula. Para distinguir específicamente las tetraspaninas de la célula T diana se expresaron exógenamente las tetraspaninas CD9 y CD81 acopladas a la proteína fluorescente GFP. Cuando estas células contactaban con células Env<sup>+</sup> la señal fluorescente se localizaba mayoritariamente en los contactos intercelulares junto con CD4 (**Figura 16**).

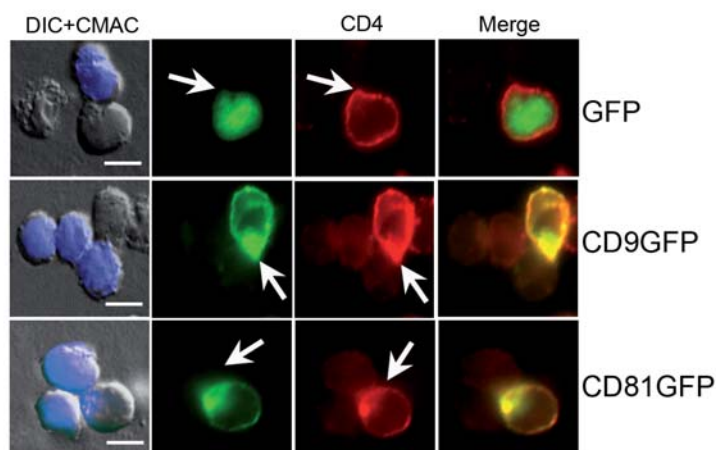




**Figura 15**

**Expresión y localización de las tetraspaninas.** **A)** Análisis por citometría de flujo de la expresión en membrana de las tetraspaninas CD9, CD81 y CD151 en la línea T CEM1.3 (panel superior) y en la línea HeLa P5 (panel inferior). **B)** Localización de la tetraspanina CD81 (teñida con el AcM 5A6 seguido de un secundario con fluorescencia verde) en células T CEM1.3 durante el contacto con una célula T Env<sup>+</sup> (marcadas con una sonda intracelular azul). En los paneles inferiores se muestra la intensidad de fluorescencia de la imagen representada mediante una escala de pseudocolor y un histograma con la intensidad de fluorescencia medida a lo largo de la línea blanca. La barra equivale a 10  $\mu$ m. **C)** Localización de las tetraspaninas CD9, CD81 y CD151 (usando los AcM VJ1/20, 5A6 y Lia 1/1.1, respectivamente) durante la formación de sincitios en el sistema HeLa. Las células verdes son HeLa P5 CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>/CCR5-GFP y las no marcadas son Env<sup>+</sup>. Se observan sincitios ya formados fusionándose con células de ambos tipos. Las tetraspaninas se concentran en los contactos intercelulares, como se puede observar en los histogramas de la derecha que representan la intensidad de fluorescencia a lo largo de las líneas dibujadas. La barra equivale a 10  $\mu$ m.

El reclutamiento de las tetraspaninas a los contactos entre dos células se observaba también en contactos homotípicos, por lo que podía ser independiente de la envuelta viral. Sin embargo, cuando las células T se exponían a partículas virales libres, CD81 se relocizaba junto con CD4 y CXCR4 en el área de *capping* (**Figura 17**). Esto no sucede con otras moléculas de membrana como CD147, que teniendo un nivel de expresión similar al de las tetraspaninas, mantiene su localización a lo largo de toda la membrana antes y después del contacto virus-célula. En ausencia de virus, CD4 y CD81 se distribuyen por toda la membrana co-localizando en algunos puntos, y la célula no tiene ninguna proyección membranosa polarizada (**Figura 17**).



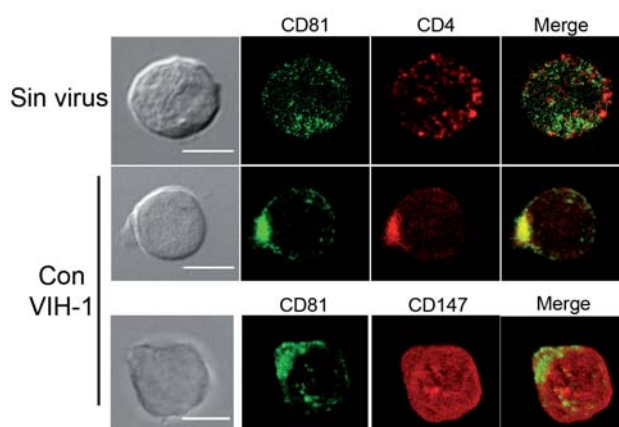
**Figura 16**

**Reclutamiento de las tetraspaninas de la célula diana a los contactos con la envuelta viral.** Células CEM 1.3 transfectadas con GFP, CD9-GFP o CD81-GFP, contactando con células T Env<sup>+</sup> (marcadas con una sonda intracelular azul) y teñidas para CD4 (CD4v4-PE). Se aprecia la relocalización de las tetraspaninas y CD4 a los lugares de contacto con la envuelta viral. Las flechas blancas marcan el contacto con la envuelta. Las barras equivalen a 10  $\mu$ m.

**Figura 17**

***Capping* provocado por partículas virales infecciosas VIH-1 NL4.3 en CEM 1.3.**

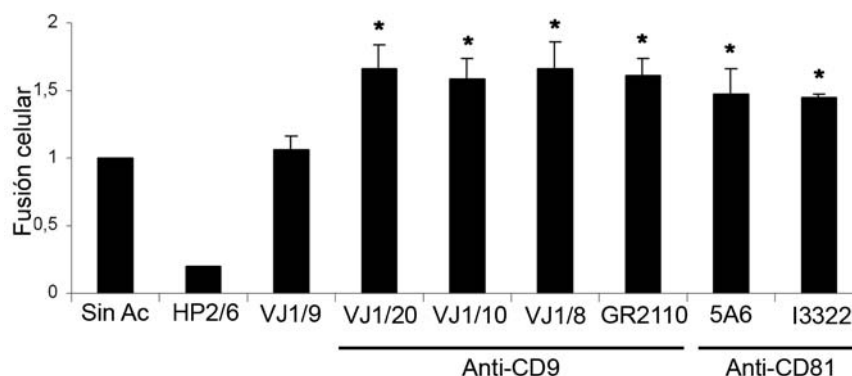
Proyecciones máximas de las series de secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal donde se puede observar cómo, en ausencia de virus (panel superior), CD4 y CD81 se distribuyen homogéneamente por la membrana co-localizando en algunos puntos. En presencia del virus, CD4 y CD81 se acumulan en la zona de *capping* (panel central), mientras que CD147 no se redistribuye a la zona de *capping* inducida por el virus (panel inferior). Las barras equivalen a 5  $\mu$ m.



## 2.2 Los anticuerpos anti-CD9 y anti-CD81 aumentan la fusión de membranas inducida por la envuelta viral y la infección

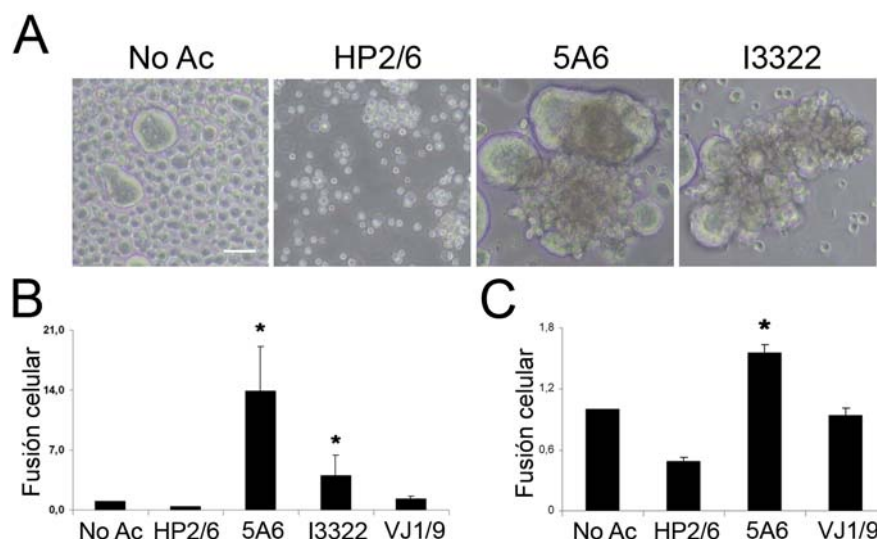
Dado que las tetraspaninas estaban en el lugar de anclaje de la envuelta viral, quisimos investigar si la preincubación de las células diana con anticuerpos anti-tetraspaninas afectaba a la formación de sincitios inducida por la envuelta. Todos los anticuerpos anti-tetraspaninas que ensayamos favorecían la formación de sincitios en menor o mayor medida en el sistema HeLa. Sin embargo, el anti-CD147 (VJ1/9), del mismo isotipo que los anticuerpos utilizados (IgG1) no tenía ningún efecto sobre la fusión celular inducida por la envuelta (**Figura 18**).

En el sistema linfóide utilizamos los anticuerpos anti-CD81, al ser esta la principal tetraspanina expresada. De nuevo, los anticuerpos anti-tetraspanina favorecían la formación de sincitios más grandes y en menor tiempo, especialmente el AcM 5A6 (**Figura 19A y B**). Este efecto se confirmó en células primarias usando linfocitos T humanos activados (**Figura 19C**).



**Figura 18**

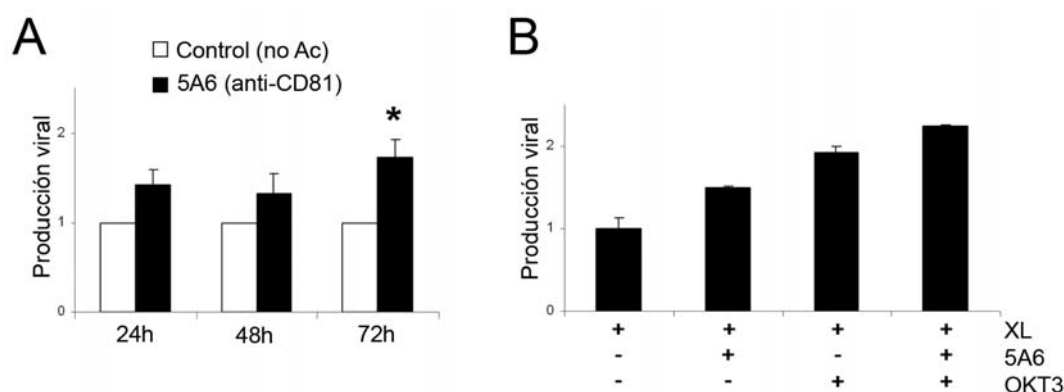
**Efecto de los anticuerpos anti-tetraspaninas en la fusión celular inducida por la envuelta viral ADA en el sistema HeLa.** El anticuerpo HP2/6, anti-CD4 que bloquea la unión CD4-gp120, se usó como control de especificidad a 10  $\mu\text{g/ml}$ , y el anticuerpo VJ1/9, anti-CD147, como control de isotipo a 5  $\mu\text{g/ml}$ . Los anticuerpos anti-tetraspaninas se utilizaron a 5  $\mu\text{g/ml}$ . Se co-cultivaron HeLa P5 con HeLa ADA durante 16 h en presencia de los anticuerpos. Los valores representados son las medias de seis experimentos independientes por triplicado normalizadas con respecto al control sin anticuerpo (No Ac)  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (Test de Student's).



**Figura 19**

**Efecto de los anticuerpos anti-CD81 en el sistema linfoide.** **A)** Microfotografías de contraste de fase mostrando la formación de sincitios a las 16 h de co-cultivo de células CEM 1.3 con Jurkat Env<sup>+</sup> en presencia o no de los anticuerpos anti-CD81 a 5  $\mu\text{g/ml}$ . El anticuerpo HP2/6 (10  $\mu\text{g/ml}$ ), anti-CD4, que bloquea la unión CD4-gp120, se usó como control de especificidad. La barra blanca equivale a 50  $\mu\text{m}$ . **B)** Cuantificación de la formación de sincitios entre células CEM 1.3 y Jurkat Env<sup>+</sup> a las 7 h de co-cultivo en presencia o no de los anticuerpos anti-CD81 (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Se muestran los controles de especificidad e isotipo. Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes por duplicado normalizados con respecto al control sin anticuerpo (No Ac)  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (Test de Student's). **C)** Cuantificación de la formación de sincitios entre linfoblastos T primarios y Jurkat Env<sup>+</sup> a las 7 h de co-cultivo en presencia o no del anticuerpo anti-CD81 5A6 (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Se muestran los controles de especificidad e isotipo. Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes por duplicado normalizados con respecto al control sin anticuerpo (No Ac)  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (Test de Student's).

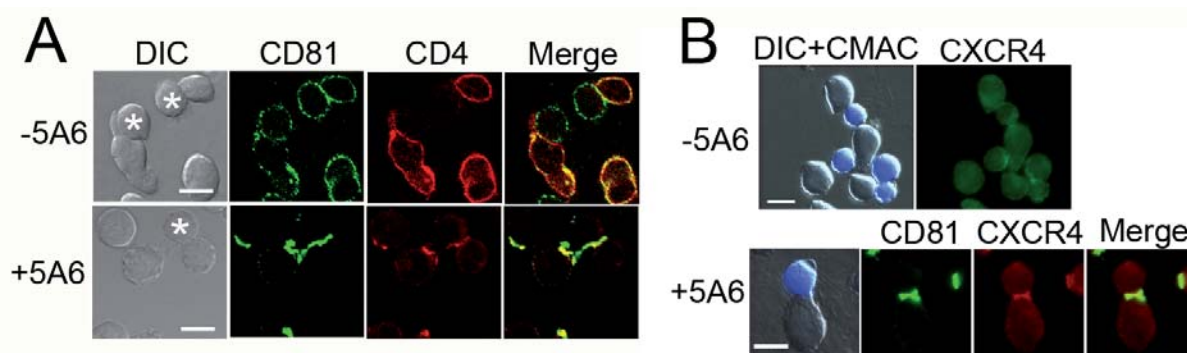
Para determinar si el efecto del anticuerpo anti-CD81 en fusión celular se reproducía en entrada viral, se infectaron con virus VIH-1 NL4.3 linfoblastos T primarios incubados previamente con el AcM 5A6. Se analizó la producción de nuevos viriones mediante ELISA para la proteína viral p24 y se observó que el tratamiento con el anticuerpo aumentaba la producción viral. Sin embargo, el efecto del anticuerpo no era tan dramático como en el proceso de fusión celular y sólo se conseguían valores estadísticamente significativos a 72 h (**Figura 20A**). Dado el papel co-activador de CD81 en linfocitos T [31, 90] y que la activación del linfocito T infectado dispara la replicación viral, quisimos ver si el anticuerpo 5A6 era capaz de actuar de manera sinérgica con un anticuerpo activador anti-CD3 aumentando la producción viral. Como se observa en la gráfica **20B**, el tratamiento con ambos anticuerpos aumentaba sólo ligeramente la producción de nuevos virus en comparación con la producción viral con cada anticuerpo por separado.



**Figura 20**

**Infección de linfoblastos T primarios con VIH-1 NL4.3.** **A)** Cuantificación de la producción viral por ELISA de la proteína viral p24 a distintos tiempos post-infección en presencia o no del anticuerpo anti-CD81 5A6 (5 µg/ml). Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes por triplicado normalizados con respecto al control sin anticuerpo (No Ac)  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (*Test de Student's*). **B)** Cuantificación de la producción viral a día 3 post-infección por ELISA de p24 en presencia o ausencia de los anticuerpos OKT3 (0,5 µg/ml) y/o 5A6 (5 µg/ml), entrecruzados con anticuerpos anti-IgGs de ratón (XL; 20 µg/ml) y pegados a la placa. Se muestran las medias de un experimento representativo, realizado por triplicado, normalizadas con respecto al control de células incubadas sólo con el entrecruzador (XL). \* indica  $P < 0.05$  (*Test de Student's*).

A continuación, analizamos por microscopía confocal la localización de CD81, CD4 y CXCR4 en las células previamente tratadas con el anticuerpo 5A6, para ver si la incubación con este anticuerpo afectaba la localización subcelular de estas moléculas. En efecto, este anticuerpo generaba acúmulos de CD81 en la membrana de las células diana dónde se agrupaban también CD4 y CXCR4 (**Figura 21**). Así, el efecto entrecruzador del anticuerpo podía estar reuniendo moléculas de CD81 que a su vez están asociadas a moléculas de CD4, facilitando así la unión productiva a la envuelta viral.



**Figura 21**

**El entrecruzamiento de CD81 mediante la incubación con el anticuerpo anti-CD81 5A6 induce el agrupamiento de CD4 y CXCR4 en la membrana plasmática.** **A)** Secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal mostrando la distinta distribución de CD81 y CD4 incubando las células diana CEM 1.3 con un anticuerpo control (-5A6) o con el anticuerpo anti-CD81 (+5A6) a 5 µg/ml. Como anticuerpo control se utilizó el D3/9 (anti-CD45) a 5 µg/ml. Las células Env<sup>+</sup> están marcadas con un asterisco blanco. Las barras blancas representan 10 µm. **B)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de campo ancho que muestran la distinta distribución de CXCR4 y/o CD81 tras incubación células CEM 1.3 durante 30 min con un anticuerpo control (-5A6) o con el anticuerpo anti-CD81 (+5A6) a 5 µg/ml. Como anticuerpo control se utilizó el D3/9 (anti-CD45) a 5 µg/ml. Las células Env<sup>+</sup> están marcadas en azul con la sonda CMAC. Las barras blancas representan 10 µm.

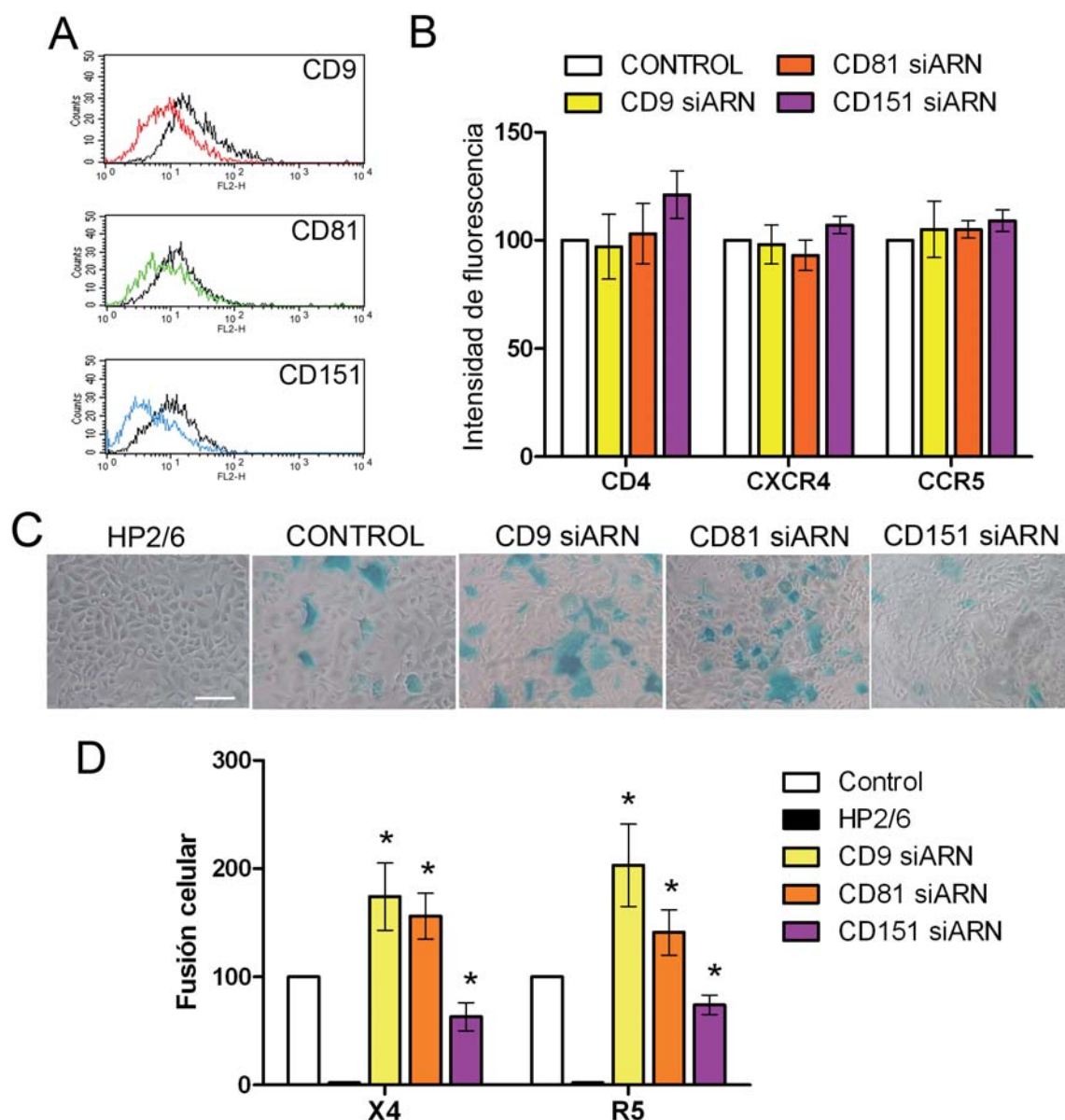
### 2.3 La interferencia de CD9 y CD81 aumenta la formación de sincitios inducida por la envuelta viral y la infección

Para averiguar si las tetraspaninas tenían un papel activo en la entrada viral y la fusión celular, y los efectos no eran debidos a otras características de los anticuerpos, tratamos de reducir la expresión de las tetraspaninas en la membrana plasmática de las células diana. Para ello utilizamos la técnica de silenciamiento de mensajeros mediante el uso de pequeños ARNs interferentes (*siRNAs*). En esta técnica se introducen en la célula oligonucleótidos de ARN que se unen específicamente a secuencias del ARN mensajero que codifica para la proteína a deplecionar, llevando a degradación dichos mensajeros.

La interferencia de cada una de las tetraspaninas no tenía ningún efecto sobre la expresión en membrana de CD4, CXCR4 y CCR5 en las células diana HeLa P5, como se comprobó por citometría de flujo para cada experimento (**Figura 22A y B**). Se utilizaron como control células transfectadas con un oligonucleótido que no reconoce ningún ARNm eucariota y que denominaremos oligonucleótido negativo (ver Materiales y Métodos).

En el sistema celular HeLa, las células diana interferidas para CD9 y CD81 eran más susceptibles a la fusión celular, mientras que las interferidas para la tetraspanina CD151 producían menos sincitios como se observaba tanto por tinción X-gal como cuantificando la actividad β-galactosidasa (**Figura 22C y D**). Este efecto era independiente del tropismo de la envuelta viral ya que sucedía tanto con envueltas T-trópicas (X4) como con envueltas M-trópicas (R5) (**Figura 22D**).

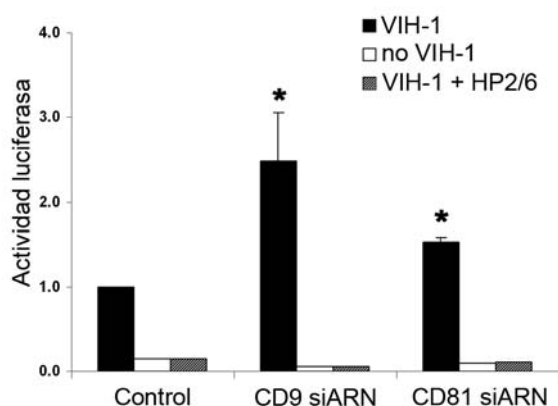




**Figura 22**

**Efecto de la interferencia de las tetraspaninas CD9, CD81 y CD151 en las células diana HeLa en la formación de sincitios inducida por la envuelta viral.** **A)** Análisis por citometría de flujo del nivel de interferencia logrado para cada tetraspanina. En color se muestra el nivel de expresión de cada tetraspanina tras el proceso de silenciamiento por ARNs interferentes, frente a su nivel de expresión en las células control transfectadas con el oligonucleótido negativo (líneas negras). **B)** Cuantificación de los niveles de expresión medidos por citometría de flujo de CD4, CXCR4 y CCR5 en células transfectadas con el oligonucleótido negativo o el oligonucleótido interferente específico para cada tetraspanina. Los valores representados son las medias de cinco experimentos independientes normalizados con respecto al control (células transfectadas con el oligonucleótido negativo)  $\pm$  SD. **C)** Tinción con X-Gal mostrando los sincitios formados entre células X4-Env<sup>+</sup> y células diana control (transfectadas con el oligonucleótido negativo) o interferidas para cada tetraspanina. La imagen de la izquierda muestra el efecto del anticuerpo bloqueante anti-CD4 HP2/6 (10  $\mu$ g/ml). La barra blanca representa 50  $\mu$ m. **D)** Cuantificación de la formación de sincitios a 16 h de co-cultivo de HeLa P5 y HeLa 243 (envuelta X4-trópica) o HeLa ADA (envuelta R5-trópica). Los valores representados son las medias de cinco experimentos independientes por triplicado normalizados con respecto al control (células transfectadas con el oligonucleótido negativo)  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (Test de Student's).

Al observar este efecto en la fusión celular inducida por la envuelta viral, quisimos analizar si la interferencia de CD9 y CD81 también aumentaba la infección directa de células diana utilizando partículas virales infecciosas. Efectivamente, la reducción de la expresión de CD9 y CD81 aumentaba la producción viral cuando las células diana silenciadas para estas tetraspaninas eran expuestas al virus, con respecto a las células control transfectadas con el oligonucleótido negativo (**Figura 23**).



**Figura 23**

**Efecto de la interferencia de CD9 y CD81 en la infección de HeLa P5 por el virus NL4.3 (X4-trópico).**

Las células se infectaron durante 5 h con la cantidad de virus equivalente a 500 ng de p24 viral por  $1 \times 10^6$  de células, se lavaron exhaustivamente, se cultivaron durante 48 h más y se lisaron. La cantidad de p24 en los lisados se cuantificó por ELISA. Como control de especificidad se utilizó el anticuerpo bloqueante anti-CD4 HP2/6 a 10  $\mu\text{g/ml}$ . Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes por triplicado normalizados con respecto al control (células transfectadas con el oligonucleótido negativo)  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (*Test de Student's*).

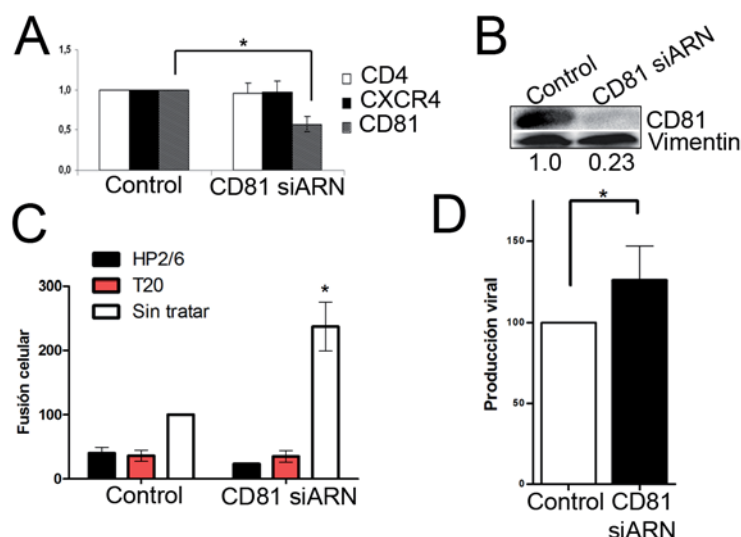
La interferencia de CD81 en células T diana (CEM 1.3) reducía los niveles de expresión de esta tetraspanina en la membrana celular en un 40-60% aunque globalmente la depleción era mayor, como se observaba por *Western-blot* (**Figura 24A y B**). La interferencia no afectaba a los niveles de expresión en membrana de CD4, CXCR4 y CCR5 en las células diana (**Figura 24A**). El silenciamiento de CD81 en las células diana producía un gran aumento en la formación de sincitios inducida por la envuelta viral (**Figura 24C**).

De nuevo, quisimos observar si el efecto en fusión celular se repetía en la infección directa por partículas infecciosas de VIH-1. Cuando se infectaron células CEM 1.3 interferidas para CD81 con partículas virales se observó una producción mayor de nuevos virus a día 3 post-infección (**Figura 24D**). El efecto sin embargo era cuantitativamente menor que el observado en la formación de sincitios.

#### 2.4 La sobreexpresión de CD9 y CD81 reduce la formación de sincitios inducida por la envuelta viral

Dado el efecto observado al reducir la expresión de las tetraspaninas en la membrana de las células diana quisimos determinar si la sobreexpresión de estas proteínas tenía un efecto en la formación de sincitios inducida por la envuelta del VIH-1.

Las células HeLa diana se transfectaron con CD9 y CD81 fusionadas a GFP y se co-cultivaron con células Env<sup>+</sup> X4 o R5. La sobreexpresión de ambas tetraspaninas inhibía ligeramente el proceso de fusión celular para ambos tropismos virales (**Figura 25A**).



**Figura 24**

**Formación de sincitios en células T interferidas para CD81.** **A)** Cuantificación de los niveles de expresión (intensidad de fluorescencia) obtenidos por citometría de flujo para CD4, CXCR4 y CD81 en células transfectadas con el oligonucleótido interferente específico frente a CD81 con respecto al nivel observado en células CEM 1.3 control (transfectadas con el oligonucleótido negativo). Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes por duplicado normalizados con respecto al control  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (Test de Student's). **B)** Análisis por Western-Blot en lisados celulares totales de células CEM 1.3 de la expresión de CD81 en células control o interferidas para CD81. La expresión de vimentina se analizó en las mismas muestras como control de carga. Los números representan la cuantificación de la banda de CD81 referida a la banda de Vimentina para cada carril. **C)** Cuantificación de la formación de sincitios en co-cultivos de 16 h de células CEM 1.3 control o interferidas para CD81 con Jurkat Env<sup>+</sup>. Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes por duplicado normalizados con respecto al control (células transfectadas con el oligonucleótido negativo)  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (Test de Student's). Como controles de especificidad se incluyen el tratamiento con el anticuerpo bloqueante de CD4 (HP2/6), y el péptido inhibidor de fusión viral T20. **D)** Producción viral cuantificada por ELISA de p24 en sobrenadantes de día 3 postinfección de células CEM 1.3 interferidas para CD81 con respecto a células control (transfectadas con el oligo negativo). Los valores representados son las medias de cinco experimentos independientes por triplicado normalizados con respecto al control  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (Test de Student's).

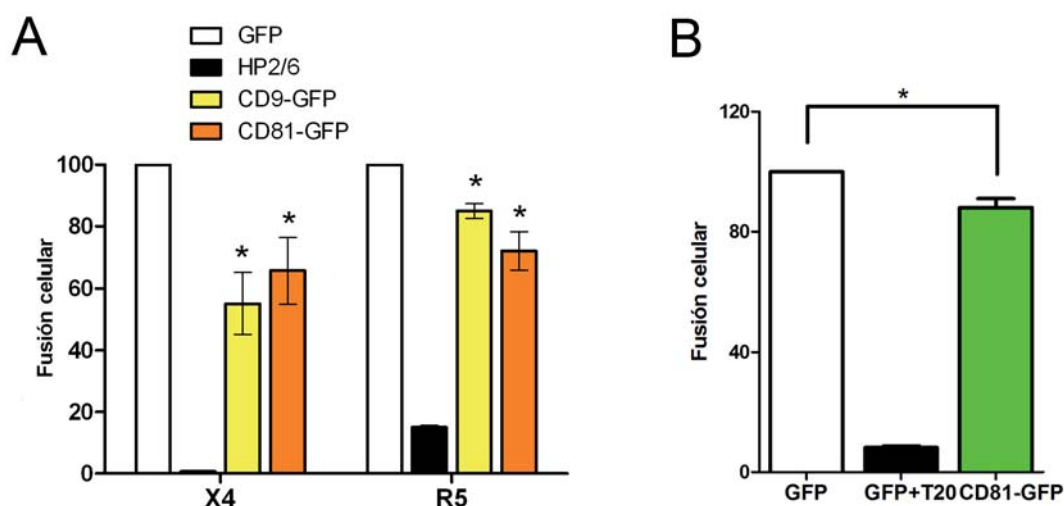
Este experimento se realizó también en el sistema linfóide utilizando CEM1.3 sobreexpresando CD81. Como se puede observar en la gráfica **25B**, el aumento en la expresión de CD81 conduce a una menor formación de sincitios.

Los efectos observados sobreexpresando las tetraspaninas eran menores que los que se veían al interferirlas, lo que parece lógico teniendo en cuenta el elevado número de moléculas de CD9 y CD81 expresadas endógenamente por las células.

## 2.5 Estudio de los mecanismos por los que la interferencia de CD81 aumenta la fusión celular inducida por la envuelta viral.

Tras observar el efecto de los anticuerpos y la interferencia de CD81 en la fusión celular nos propusimos averiguar las causas que lo producían.



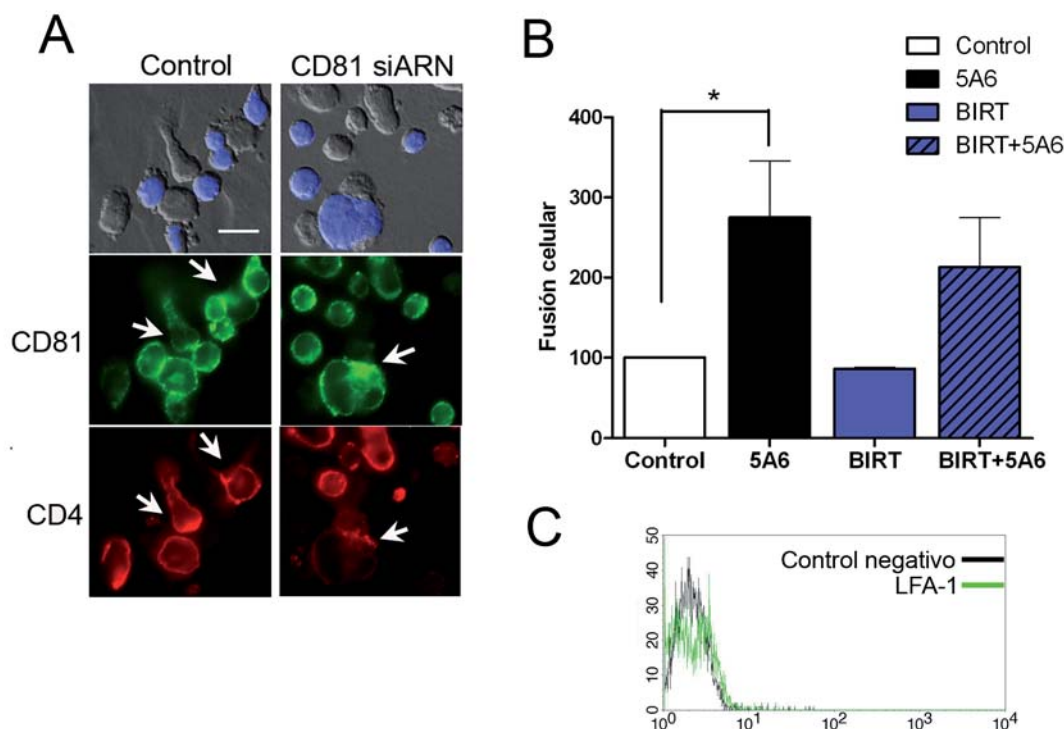


**Figura 25**

**Efecto de la sobreexpresión de tetraspaninas en las células diana sobre la formación de sincitios inducida por la envuelta viral.** **A)** Formación de sincitios inducidos por células con envoltas X4- o R5- trópicas en células HeLa P5 que sobreexpresan las tetraspaninas CD9 o CD81 acopladas a GFP. Como control se usaron células P5 transfectadas con el vector vacío, que codifica para GFP. Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes por triplicado normalizados con respecto al control (GFP)  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (*Test de Student's*). **B)** Cuantificación del número de sincitios por citometría de flujo en co-cultivos de 16h de células Env<sup>+</sup> con CEM 1.3 transfectadas con CD81-GFP. Como control se utilizaron células transfectadas con el vector pAcGFP-N1 vacío (GFP). Los valores representados son las medias de cuatro experimentos independientes por duplicado normalizados con respecto al control  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (*Test de Student's*).

Inicialmente comprobamos por inmunofluorescencia si el silenciamiento de CD81 alteraba el patrón de localización de CD4 durante los contactos entre células T diana y células Env<sup>+</sup>. Así se observó que CD4 se reclutaba normalmente a los contactos con la envuelta viral de forma similar a células control (**Figura 26A**), por lo que la interferencia de CD81 no afecta ni al nivel de expresión en membrana de CD4 ni a su reclutamiento por la envuelta.

Dada la conocida capacidad de las tetraspaninas para modular la actividad de moléculas asociadas a ellas [5, 10], la interacción funcional ya descrita entre CD81 y LFA-1 [18], y el efecto facilitador de la formación de sincitios de esta integrina [77, 91], comprobamos si el efecto que habíamos descrito se debía a la modulación por parte de CD81 de la capacidad adherente de LFA-1. Para ello, tratamos las células diana con BIRT-377, inhibidor específico de LFA-1 y/o anti-CD81 antes de co-cultivarlas con células presentadoras de la envuelta viral. Sin embargo, el bloqueo de LFA-1 inhibía levemente la fusión celular un 15% (sin ser estadísticamente significativo), y no era capaz de compensar más que ligeramente el efecto del anticuerpo 5A6 (**Figura 26B**). Además, la línea celular T parecía expresar bajos niveles de LFA-1 como observamos por citometría de flujo (**Figura 26C**), por lo que es posible que en este sistema otras integrinas estén mediando la adhesión intercelular.



**Figura 26**

**Análisis de los efectos de CD81 sobre la localización de CD4 y la función de LFA-1.** **A)** Localización por inmunofluorescencia de CD81 en el momento de la fusión celular (flechas blancas) inducida por la envuelta viral en células CEM 1.3 control o interferidas para CD81. Las células Env<sup>+</sup> se marcaron con una sonda intracelular azul. La barra blanca representa 10  $\mu$ m. **B)** Cuantificación por citometría de flujo del número de sincitios formados entre células T CEM 1.3 y Jurkat Env<sup>+</sup> en presencia o ausencia del anticuerpo anti-CD81 5A6 (5  $\mu$ g/ml) y/o el inhibidor químico de LFA-1, BIRT-377 (20  $\mu$ M) durante 7 h. Los valores representados son las medias de cuatro experimentos independientes por duplicado normalizados con respecto al control (células sin tratamiento)  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (*Test de Student's*). **C)** Cuantificación por citometría de flujo de los niveles de expresión de LFA-1 en CEM 1.3 (línea verde) con respecto al control negativo de marcaje X63 (línea negra).

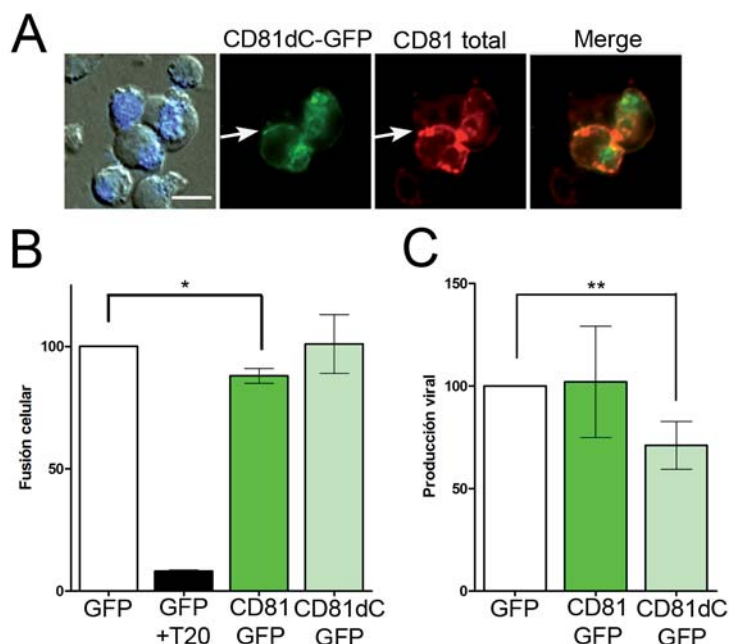
## 2.6 Implicación de la región citoplasmática C-terminal de CD81 en el ciclo del VIH-1

El mecanismo por el cual CD81 estaba reduciendo la entrada del virus y la fusión celular podía deberse a las interacciones de esta tetraspanina con componentes intracelulares, en lugar de sus asociaciones dentro del plano de la membrana plasmática. Para comprobar esta hipótesis construimos una proteína CD81 truncada en su región citoplasmática C-terminal utilizando oligonucleótidos diseñados para introducir una diana de restricción tras el último segmento transmembrana (TM4) de CD81. Por medio de PCR y utilizando como molde el ADNc de CD81 total fusionado con GFP se consiguió un vector que codificaba para la proteína truncada de CD81 acoplada a GFP (ver Materiales y Métodos). Se comprobó la expresión y localización de la proteína truncada de CD81 por inmunofluorescencia tiñendo el CD81 total en rojo y comparando su patrón con el de la fluorescencia verde debida a la construcción GFP (**Figura 27A**). La proteína truncada de CD81 se localizaba en la membrana plasmática fundamentalmente,

al igual que el CD81 silvestre, pero no se acumulaba en los contactos intercelulares como la proteína CD81 endógena.

Con esta nueva construcción se realizaron ensayos de fusión celular inducida por la envuelta viral en células T diana transfectadas con el CD81 completo o el truncado para la región citoplasmática C-terminal. La expresión de CD81 truncado no inhibía significativamente la fusión celular inducida por la envuelta viral como hacía el CD81 completo (**Figura 27B**). Por tanto, CD81 sin su región citoplasmática C-terminal pierde la capacidad de reducir la formación de sincitios.

Además, estas células diana transfectadas para CD81 completo o truncado se infectaron con partículas virales libres. Mientras que CD81 completo no llegaba a producir ningún efecto estadísticamente significativo en la producción viral, el truncado de CD81 reducía los niveles de infección (**Figura 27C**).



**Figura 27**

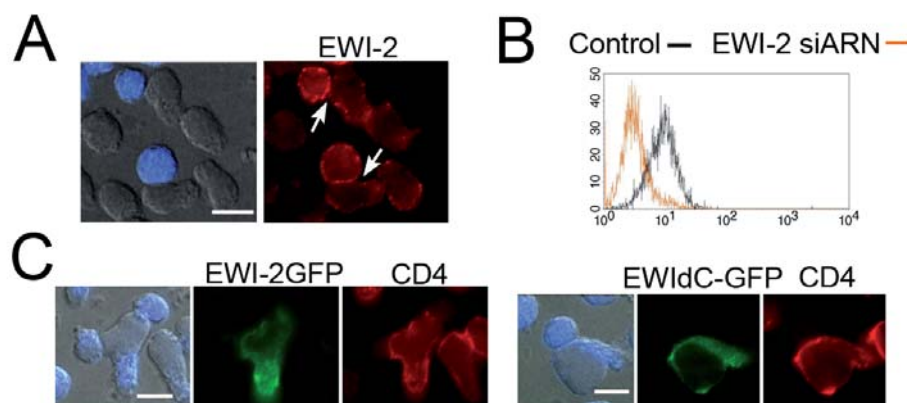
**Efecto del mutante de delección de la región C-terminal citoplasmica de CD81 en la fusión celular y la infección por VIH-1.** **A)** Inmunofluorescencias mostrando la distribución del mutante CD81 $\Delta$ Cyt-GFP (CD81dC-GFP) en células CEM 1.3 durante la formación de sincitios frente a la tinción del total de CD81. Las células Jurkat Env<sup>+</sup> fueron marcadas con una sonda intracelular azul. La flecha blanca señala un contacto donde CD81 se acumula, pero no así CD81 $\Delta$ Cyt-GFP. La barra representa 10  $\mu$ m. **B)** Cuantificación por citometría de flujo del número de sincitios formados al co-cultivar células Env<sup>+</sup> con CEM 1.3 transfectadas con CD81-GFP o CD81 $\Delta$ Cyt-GFP. Como control se utilizaron células transfectadas con el vector pAcGFP-N1 vacío (GFP). Los valores representados son las medias de cuatro experimentos independientes por duplicado normalizados con respecto al control  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (Test de Student's). **C)** Producción viral cuantificada por ELISA de p24 en sobrenadantes de día 3 postinfección de células CEM 1.3 transfectadas con CD81-GFP o CD81 $\Delta$ Cyt-GFP e infectadas con virus VIH-1 NL4.3. Como control se utilizaron células transfectadas con el vector pAcGFP-N1 vacío (GFP). Los valores representados son las medias de cuatro experimentos independientes por duplicado normalizados con respecto al control  $\pm$  SD. \*\* indica  $P < 0.005$  (Test de Student's).

Por tanto, CD81 debía estar implicado en más procesos del ciclo viral que la fusión de membranas y de forma compensatoria. Además, la región citoplasmática C-terminal de CD81 debía ser importante para alguna de las etapas posteriores a la fusión de membranas, quizás debido a su asociación con alguna proteína intracelular.

## 2.7 Papel de EWI-2, proteína asociada a CD81, en la fusión de membranas y la infección viral

EWI-2 se asocia estrechamente con CD81 y tiene un papel regulador negativo sobre CD81 durante la infección por VHC [92]. Por tanto quisimos comprobar si EWI-2 tenía algún efecto en la fusión celular y la infección por VIH-1.

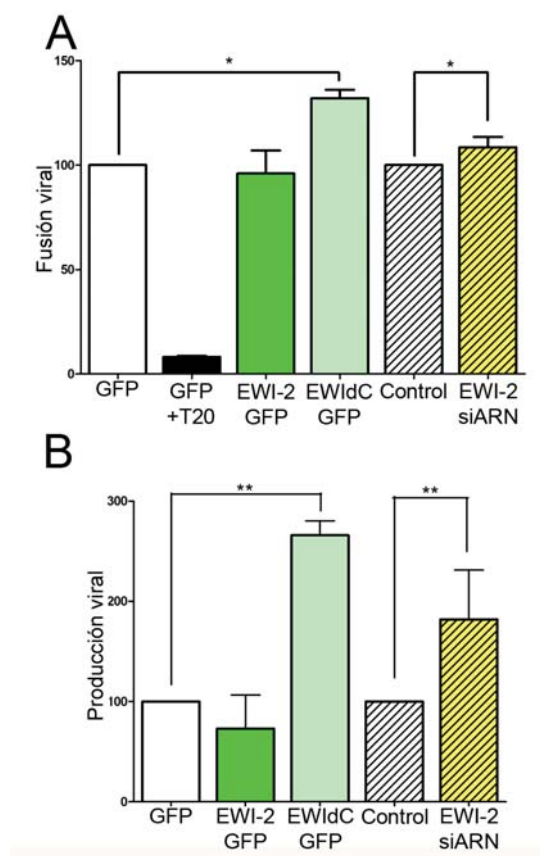
En primer lugar marcamos EWI-2 en células diana contactando con células Env<sup>+</sup> y observamos que EWI-2 también se relocalizaba hacia los contactos que dan lugar a la formación de sincitios (**Figura 28A**). Para estudiar si esta molécula tenía algún efecto funcional en este proceso, redujimos su expresión mediante oligonucleótidos de ARN específicos para el ARNm de EWI-2. La interferencia de EWI-2 se conseguía más fácilmente que la de CD81 y en mayor porcentaje, probablemente debido a la menor expresión basal de esta proteína en las células T (**Figura 28B**). Además se generó una construcción de EWI-2 acoplada a GFP y una construcción de EWI-2 sin en su región citoplasmática acoplada a GFP a partir de la construcción que codificaba la molécula completa. Se observó una distribución similar a lo largo de la membrana plasmática tanto para la construcción EWI2-GFP como para la EWIΔCyt-GFP (**Figura 28C**).



**Figura 28**

**Localización de EWI-2 en la fusión celular inducida por la envuelta viral.** A) Localización de EWI-2 durante la formación de sincitios entre células Jurkat Env<sup>+</sup> (marcadas con una sonda intracelular azul) y células CEM 1.3 tras co-cultivarlas durante 3 h. La barra blanca representa 10  $\mu$ m. B) Cuantificación por citometría de flujo de los niveles de expresión en membrana de EWI-2 en células CEM 1.3 transfectadas con el oligonucleótido de interferencia específico para esta proteína (línea naranja) o con el oligonucleótido negativo (línea negra). C) Inmunofluorescencias mostrando la distribución en CEM 1.3 de EWI-2GFP y EWIΔCyt-GFP (EWIΔC-GFP) durante la formación de sincitios. La tinción con el anticuerpo anti-CD4 T4 se muestra en rojo. Las células Jurkat Env<sup>+</sup> están marcadas con una sonda intracelular azul. La barra blanca representa 10  $\mu$ m.

La interferencia de la proteína EWI-2 endógena y la sobreexpresión del truncado de EWI-2 (EWIΔCyt-GFP) aumentaban la formación de sincitios y la infección por partículas virales libres (**Figura 29A y B**, respectivamente). Sin embargo, la sobreexpresión de la molécula silvestre de EWI-2 (EWI2-GFP) no afectaba a ninguno de los procesos. Así, el truncado de EWI-2 parece actuar como una forma dominante negativa puesto que tiene el mismo efecto que el silenciamiento de EWI-2.



**Figura 29**

**Papel de EWI-2 en la fusión celular y la infección viral.**

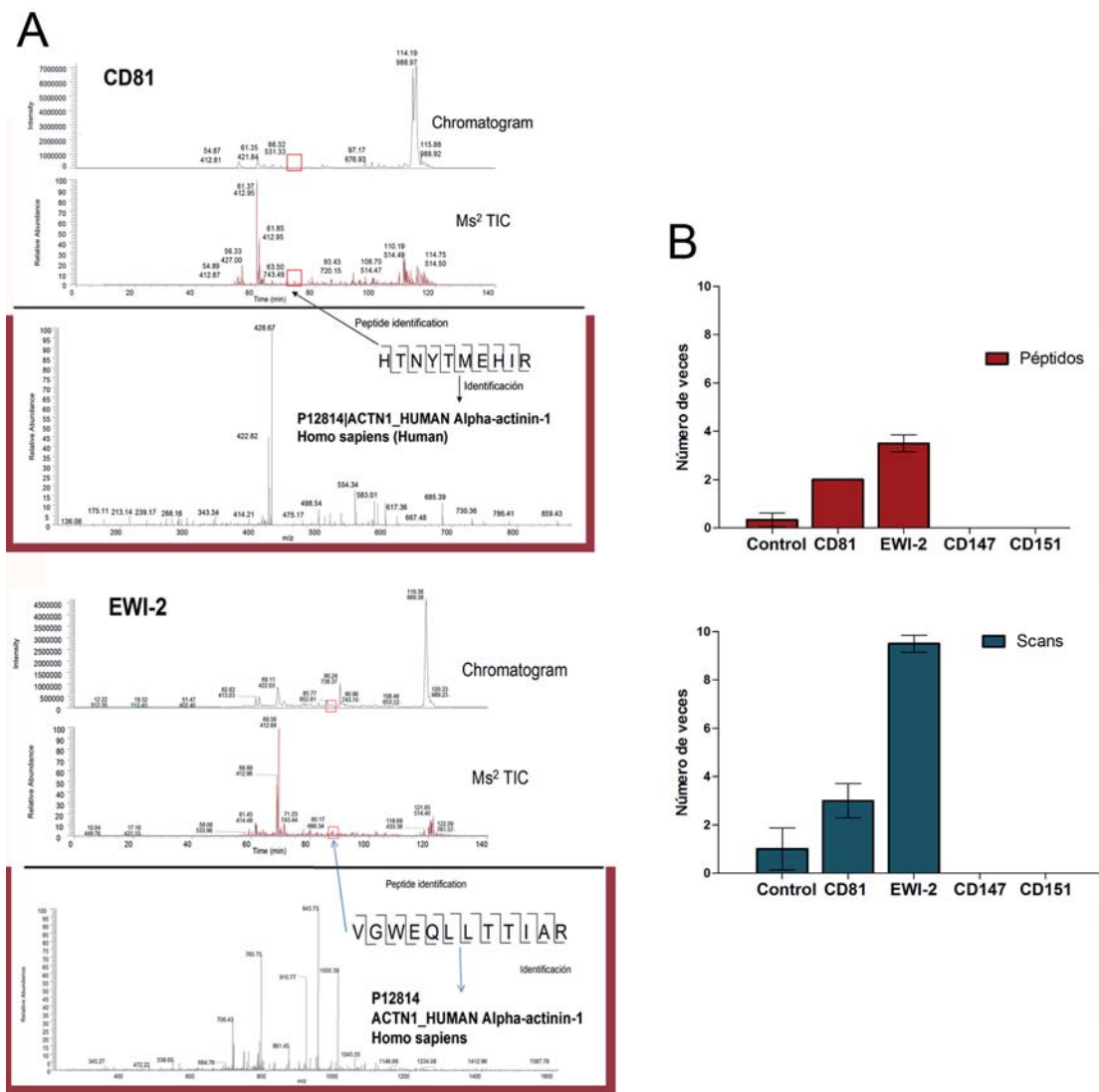
**A)** Cuantificación mediante citometría de flujo del número de sincitios formados en co-cultivos de células Env<sup>+</sup> con CEM 1.3 transfectadas con EWI-2GFP, EWIΔCyt-GFP, o el oligonucleótido de interferencia específico para esta molécula. Los valores representados son las medias de cuatro experimentos independientes por duplicado normalizados con respecto a cada control (células transfectadas con el vector pAcGFP-N1 vacío (GFP) o con el oligonucleótido negativo (Control))  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (Test de Student's). **B)** Producción viral cuantificada por ELISA de p24 en sobrenadantes de día 3 postinfección de células CEM 1.3 transfectadas con EWI-2-GFP, EWIΔCyt-GFP o con el oligonucleótido de interferencia para esta proteína infectadas con virus NL4.3. Los valores representados son las medias de siete experimentos independientes por triplicado normalizados con respecto a cada control (células transfectadas con el vector pAcGFP-N1 vacío (GFP) o con el oligonucleótido negativo (Control))  $\pm$  SD. \*\* indica  $P < 0.005$  (Test de Student's).

### 3. ESTUDIO DEL PAPEL DE PROTEÍNAS INTRACELULARES ASOCIADAS A LA MEMBRANA Y AL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA FUSIÓN E INFECCIÓN POR VIH-1

#### 3.1 $\alpha$ -Actinina en la infección viral

Para ahondar en el mecanismo de los efectos observados al alterar la expresión de CD81 y EWI-2 o al introducir mutantes truncados para regiones citoplasmáticas, se realizó un análisis proteómico utilizando las regiones citoplasmáticas C-terminales de CD81 y EWI-2 y así identificar moléculas que se asociaran específicamente a dichos dominios. Una de las moléculas que se identificaron mediante este análisis fue  $\alpha$ -Actinina (**Figura 30A**).  $\alpha$ -Actinina se asociaba tanto a CD81 como a EWI-2 aunque existía una preferencia por EWI-2 como se puede observar en la gráfica **30B**.





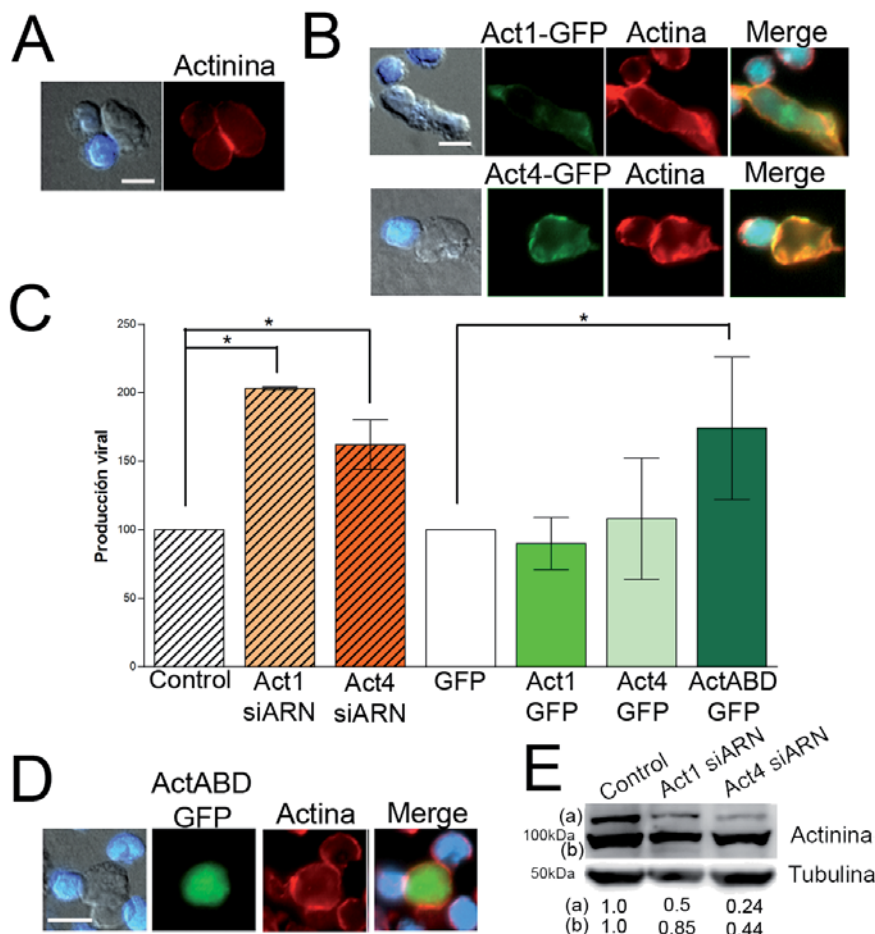
**Figura 30**

**Análisis proteómico de la interacción de las regiones citoplasmáticas C-terminales de CD81 y EWI-2. A)** Análisis mediante espectrometría de masas de las muestras obtenidas a partir de ensayos de *pull-down* de lisados de linfoblastos T con los péptidos biotinilados correspondientes a las regiones citoplasmáticas C-terminales de CD81 y EWI-2 (respectivamente). Se muestran dos cromatogramas amplificando las zonas recuadradas en rojo sucesivamente y la identificación de un péptido de  $\alpha$ -Actinina en cada caso (paneles recuadrados en rojo). **B)** Gráficas mostrando el número de péptidos y de *scans* de  $\alpha$ -Actinina identificados para cada región C-terminal-biotinilada. Como controles se usaron sefarosa-estreptavidina sin péptidos (control), y los péptidos biotinilados de las regiones citoplasmáticas C-terminales de CD147 y la tetraspanina CD151. Los valores representados son las medias de dos experimentos independientes  $\pm$  SD.

Se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia para localizar  $\alpha$ -Actinina durante los contactos entre células diana y células Env<sup>+</sup>. La proteína endógena co-localizaba con F-Actina y era reclutada a los contactos T-Env<sup>+</sup> (**Figura 31A**). Además, las construcciones salvajes de  $\alpha$ -Actinina (isoformas 1 ó 4) acopladas a GFP también tenían una distribución cortical y estaban presentes en los contactos entre células diana y células Env<sup>+</sup> (**Figura 31B**).

A continuación se analizó el posible efecto de la interferencia y la sobreexpresión de esta proteína en células T diana en el proceso de infección viral. La interferencia de  $\alpha$ -Actinina-1

ó 4 (**Figura 31E**) aumentaban la producción viral, mientras que la sobreexpresión de dichas proteínas no tenía ningún efecto (**Figura 31C**). La sobreexpresión de una forma mutada de  $\alpha$ -Actinina que carece del dominio de unión a Actina (ActininaABD-GFP), por lo que se encuentra deslocalizada en el citoplasma (**Figura 31D**), también aumentaba la infección de las células T por el VIH-1 (**Figura 31C**). Por tanto, la pérdida de unión  $\alpha$ -Actinina a Actina tiene el mismo efecto sobre la infección viral que el silenciamiento de  $\alpha$ -Actinina.



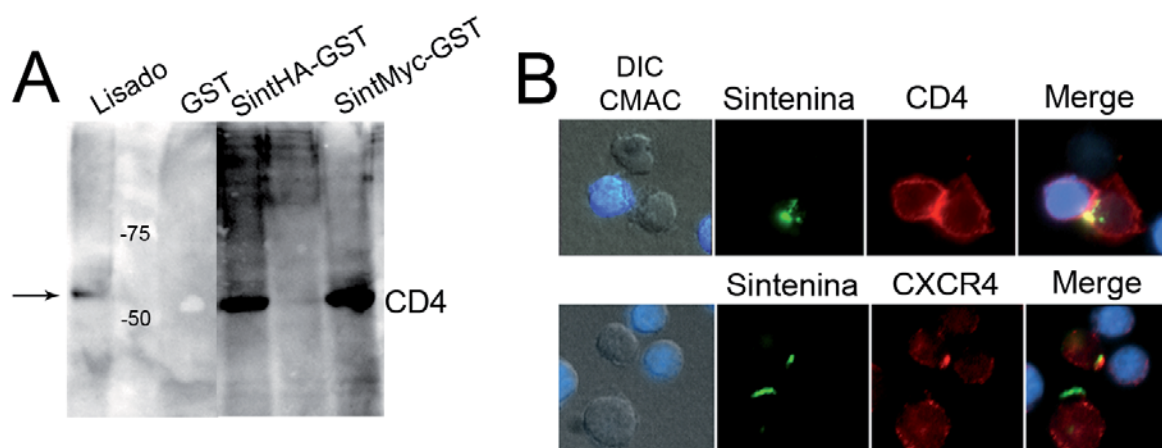
**Figura 31**

**$\alpha$ -Actinina regula la infección viral.** **A)** Localización de  $\alpha$ -Actinina-1/4 en la sinapsis viral entre células Env<sup>+</sup> (marcadas con una sonda intracelular azul) y células CEM 1.3 co-cultivadas durante 3 h. La barra blanca representa 10  $\mu$ m. **B)** Inmunofluorescencias mostrando la distribución de las construcciones  $\alpha$ -Actinina-1 y 4-GFP con respecto a la de F-Actina (teñida con faloidina-568 de fluorescencia roja), en contactos entre CEM 1.3 y Jurkat Env<sup>+</sup> (marcadas con una sonda intracelular azul). La barra blanca representa 10  $\mu$ m. **C)** Producción viral cuantificada por ELISA de p24 en sobrenadantes de día 3 postinfección de células CEM 1.3 transfectadas con  $\alpha$ -Actinina-1, 4-GFP, ActininaABD-GFP o con los oligonucleótidos interferentes para las isoformas 1 y 4 de esta proteína (Act1siARN y Act4siARN). Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes por triplicado normalizados con respecto a cada control (células transfectadas con el vector pAcGFP-N1 vacío (GFP) o con el oligonucleótido negativo (Control))  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (Test de Student's). **D)** Distribución del mutante ActininaABD-GFP frente a F-Actina (teñida con faloidina-568) durante el contacto entre células CEM 1.3 y Jurkat Env<sup>+</sup> (marcadas con una sonda intracelular azul). La barra blanca representa 10  $\mu$ m. **E)** Análisis por Western-blot en lisados celulares totales de células CEM 1.3 de la expresión de  $\alpha$ -Actinina en células control o interferidas para  $\alpha$ -Actinina. La expresión de tubulina se analizó en las mismas muestras como control de carga. Los números representan la cuantificación de las bandas de  $\alpha$ -Actinina (a y b) referidas a la banda de tubulina para cada carril y tomar normalizadas respecto al valor obtenido para las células control.

### 3.2 Sintenina-1 afecta a la entrada e infección del VIH-1

Sintenina-1 se asocia a varias proteínas mediante sus dominios PDZ y se había inmunoprecipitado con la tetraspanina CD63 [46]. Por otra parte, la región C-terminal de CD4 presenta una secuencia de unión a dominios PDZ (la secuencia consenso de unión a PDZ clase I es (S/T)-X-Φ, donde Φ es un aminoácido hidrofóbico; la secuencia encontrada en el C-terminal de CD4 es S-P-I) [93]. Para explorar la posible asociación de CD4 con Sintenina-1, realizamos ensayos de *pull-down* utilizando construcciones de Sintenina-1 acopladas a GST. Como se puede ver en la **Figura 32A**, CD4 se asociaba tanto a Sintenina-HA-GST como a Sintenina-Myc-GST de forma específica (no se asocia a GST sola). Por tanto, Sintenina-1 es capaz de unirse a CD4, receptor de VIH-1.

A continuación, analizamos por inmunofluorescencia la localización de Sintenina-1 en células T diana contactando con células T Env<sup>+</sup>. Esta proteína aparece formando agregados moleculares subcorticales y de forma difusa por el citoplasma de las células aisladas. Sin embargo, en células contactando con la envuelta, Sintenina-1 se localizaba completamente en la zona de interacción con la célula Env<sup>+</sup> junto con CD4 y CXCR4 (**Figura 32B**).



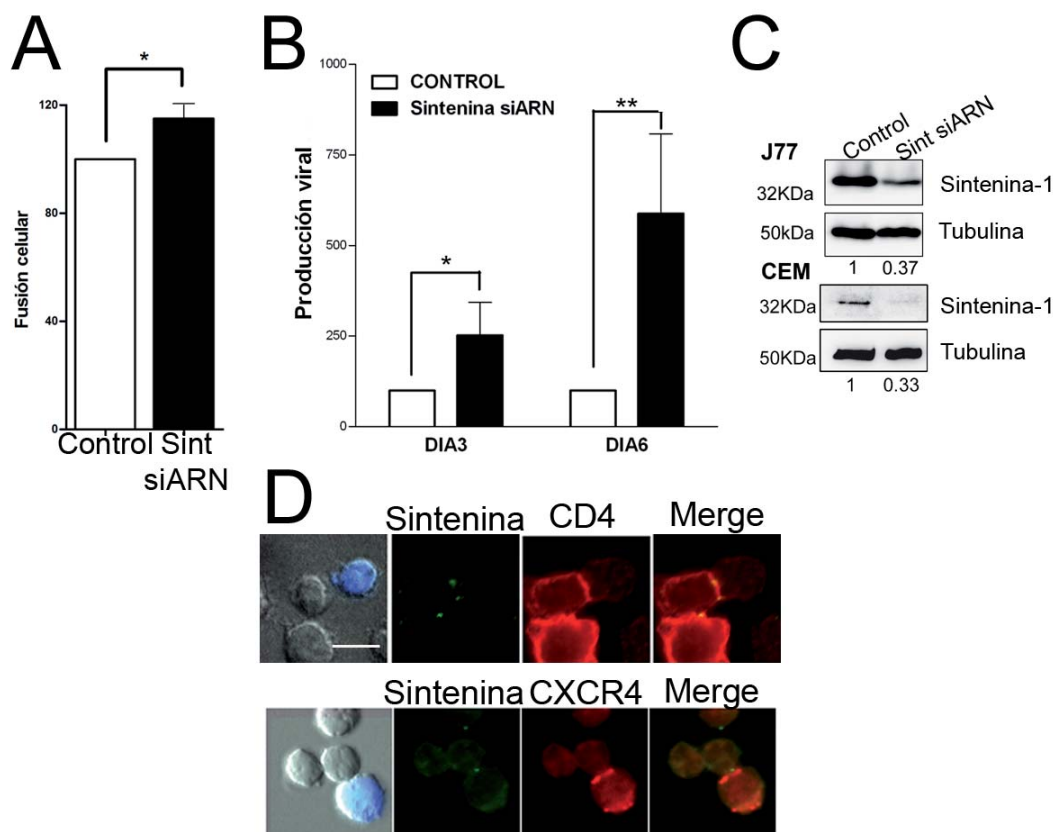
**Figura 32**

**Asociación y localización de CD4 y Sintenina-1.** **A)** Análisis por *Western-blot* del *pull-down* de lisados de linfoblastos T con GST, Sintenina-HA-GST y Sintenina-Myc-GST y revelado con anti-CD4 (HP2/6 a 2 µg/ml). En el carril con los marcadores de los pesos moleculares se muestran dos pesos moleculares en kDa. **B)** Inmunofluorescencias mostrando la localización de Sintenina-1 (teñida con el Ac anti-Sintenina-1 seguido de un secundario GAR-488) junto a CD4 y CXCR4 (teñidos usando los anticuerpos T4 y anti-CXCR4-biotina seguidos de un secundario GAM-568) en co-cultivos de 2 h entre células CEM 1.3 y células Env<sup>+</sup> (marcadas con una sonda intracelular azul). La barra blanca equivale a 10 µm.

Procedimos a interferir la expresión de Sintenina-1 en las células diana y analizar la fusión celular y la infección en estas células con respecto a células control transfectadas con el oligonucleótido negativo. Las células interferidas para Sintenina-1 fusionaban ligeramente más que las células control, pero sobre todo, se infectaban mejor, ya que la producción viral aumentaba alrededor de 2,5 veces a las 72h y más de 5 veces a día 6 (**Figura 33A y B**, respectivamente). Sin



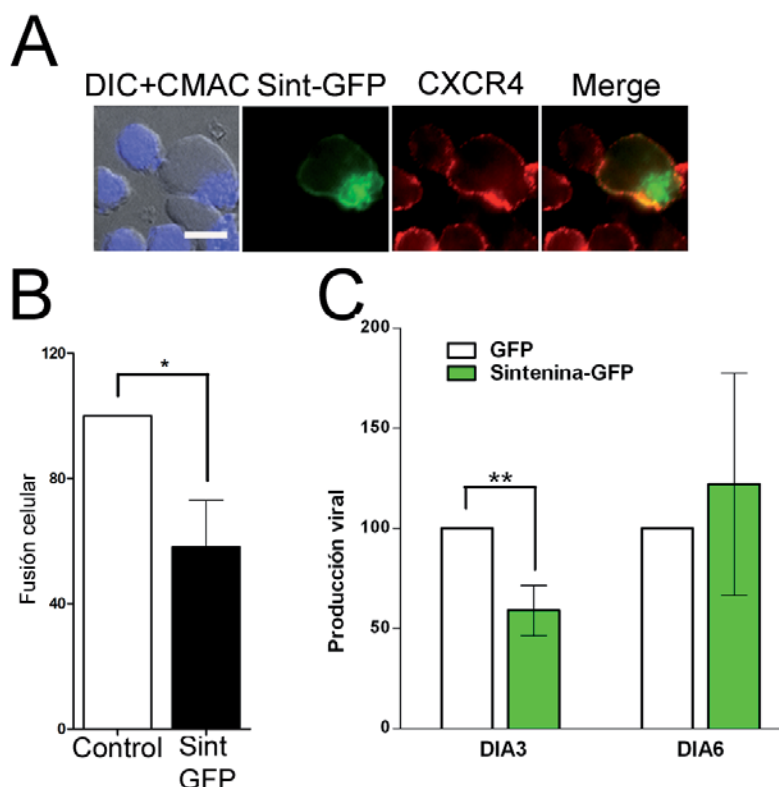
embargo, la localización subcelular de CD4 y CXCR4 no parecía variar al interferir Sintenina. La Sintenina restante después de interferir su expresión (en muchos experimentos menos del 20% de la Sintenina-1 basal; *Western-blot* de la expresión de Sintenina-1 tras su interferencia en **Figura 33C**) seguía reclutándose a los contactos con la envuelta (**Figura 33D**).



**Figura 33**

**Efecto del silenciamiento de Sintenina-1 en los procesos dirigidos por la envuelta viral.** **A)** Cuantificación del número de sincitios formados mediante citometría de flujo de co-cultivos de células Env<sup>+</sup> con CEM 1.3 transfectadas con el oligonucleótido negativo (Control) o con el interferente específico para Sintenina-1 (Sint siARN). Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes por duplicado normalizados con respecto al control  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (*Test de Student's*). **B)** Producción viral cuantificada por ELISA de p24 en sobrenadantes de día 3 y 6 postinfección de células CEM 1.3 transfectadas con el oligonucleótido interferente para Sintenina-1 (Sintenina siARN) o el oligonucleótido negativo (Control). Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes por triplicado normalizados con respecto al control  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (*Test de Student's*); \*\* indica  $P < 0.005$  (*Test de Student's*). **C)** Análisis por *Western-blot* en lisados celulares totales de células Jurkat J77 y CEM 1.3 de la expresión de Sintenina-1 en células control o interferidas para esta proteína. La expresión de tubulina se analizó en las mismas muestras como control de carga. Los números representan la cuantificación de la banda de Sintenina-1 referida a la banda de tubulina para cada carril y normalizadas respecto al valor obtenido para las células control. **D)** Inmunofluorescencias mostrando la localización de Sintenina (Sint), CD4 y CXCR4 en células CEM 1.3 interferidas para Sintenina-1 contactando con células Env<sup>+</sup> (marcadas con una sonda intracelular azul). Se realizó una primera inmunotinción con el Ac anti-Sintenina-1 seguido del Ac secundario GAR-488 y una segunda inmunotinción con el anti-CD4 T4 o el anti-CXCR4-biotina seguidos del Ac secundario GAM-568. La barra equivale a 10  $\mu$ m.

Para completar este estudio sobreexpresamos Sintenina-1 en las células diana transfectando una construcción fusionada a la proteína fluorescente GFP. Sintenina-GFP tenía una distribución cortical, sin afectar al patrón de CD4 y CXCR4, y seguía presente en los lugares de interacción con las células Env<sup>+</sup> como se observaba por inmunofluorescencia (**Figura 34A**). La sobreexpresión de Sintenina-1 inhibía la fusión celular y la infección por VIH-1 (**Figura 34B y C**). Dado que la expresión de Sintenina-GFP era más transitoria en el tiempo que la interferencia, la producción viral a día 6 no mantenía una diferencia estadísticamente significativa.



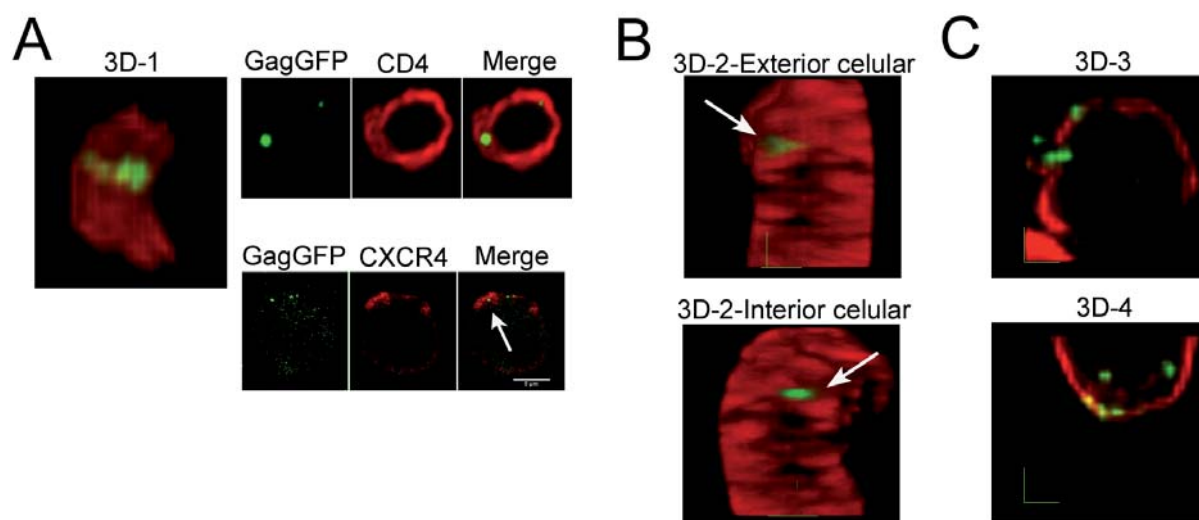
**Figura 34**

**Efecto de la sobreexpresión de Sintenina-1 en la fusión celular y la infección viral.** **A)** Inmunofluorescencias mostrando la localización de Sintenina-GFP y CXCR4 (teñido con el Ac anti-CXCR4-biotina seguido del Ac secundario GAM-568) en células CEM 1.3 contactando con células Env<sup>+</sup> (marcadas con una sonda intracelular azul). La barra blanca equivale a 10  $\mu$ m. **B)** Cuantificación mediante citometría de flujo del número de sincitios formados en co-cultivos de 16 h de células Env<sup>+</sup> con CEM 1.3 transfectadas con Sintenina-GFP (Sint-GFP) o con el vector vacío (GFP). Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes por duplicado normalizados con respecto al control (GFP)  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (*Test de Student's*). **C)** Producción viral cuantificada por ELISA de p24 en sobrenadantes de día 3 y 6 postinfección de células CEM 1.3 transfectadas con Sintenina-GFP o con el vector vacío (GFP). Los valores representados son las medias de cuatro experimentos independientes por triplicado normalizados con respecto al control (GFP)  $\pm$  SD. \*\* indica  $P < 0.005$  (*Test de Student's*).

### 3.3 Interacción virus-célula y el papel de Sintenina-1

A continuación utilizamos partículas pseudovirales (VLPs; *virus-like particles*) generadas co-expresando en células empaquetadoras el polipéptido estructural de VIH-1 *Gag*, fusionado

con la proteína fluorescente verde GFP ( $\lambda_{\text{emisión}}=510 \text{ nm}$ ) o la roja Cherry ( $\lambda_{\text{emisión}}=610 \text{ nm}$ ) y la envuelta viral X4-trópica (ver Materiales y Métodos). Estas partículas pseudovirales se comportan como virus inmaduros y son capaces de fusionar la envuelta viral con la membrana celular. Sin embargo, no son capaces de producir nuevos virus por lo que se denominan partículas de un solo ciclo o no replicativas. Con esta herramienta observamos por microscopía confocal el anclaje de las partículas pseudovirales a células diana a diferentes temperaturas que bloquean ( $4^{\circ}\text{C}$ ) o ralentizan ( $16^{\circ}\text{C}$ ) el proceso de entrada viral (**Figura 35A y B** respectivamente; **Reconstrucciones 3D-1 y 2**; ver videos **3D-1 y 3D-2**). En estas imágenes se podía observar cómo se anclaban las partículas pseudovirales a la membrana celular contactando con CD4 y CXCR4. En algunos casos se veía una co-localización directa del virus y los receptores, mientras que en otros sólo una acumulación de las moléculas celulares en torno a las partículas. Estos patrones diferentes de localización pueden deberse a que en el momento de la fijación de las muestras cada partícula se encontrara más o menos anclada a la célula y hubiese estado en contacto más o menos tiempo con CD4 y CXCR4.



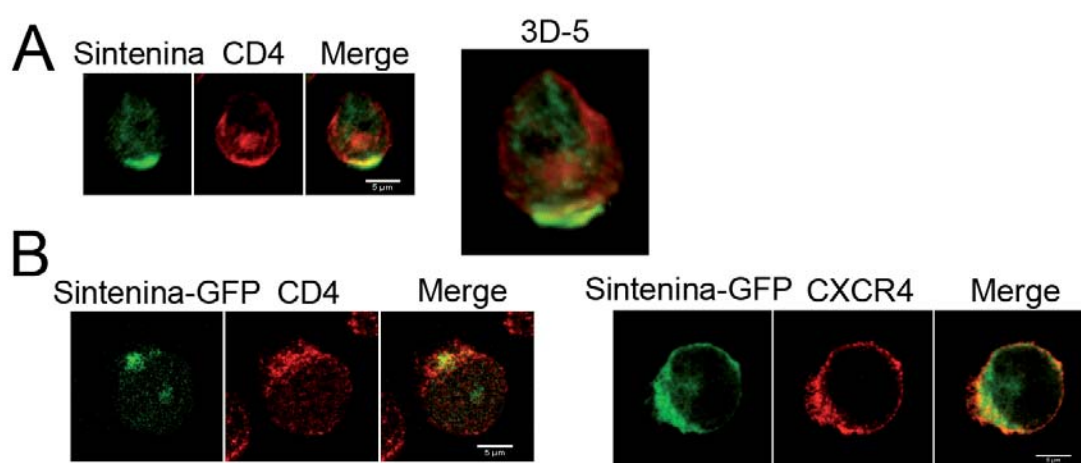
**Figura 35**

**Interacción de partículas pseudovirales-GFP (Gag-GFP) con células diana CEM 1.3.** **A)** Proyecciones medias de las series de secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal de células CEM 1.3 incubadas con pseudopartículas virales-GFP a  $4^{\circ}\text{C}$ , fijadas y teñidas para CD4 o CXCR4 (Ac T4 o anti-CXCR4-biotina seguido del Ac secundario GAM-568). A la izquierda se puede ver ampliificada la zona de contacto entre las partículas pseudovirales y la célula en una reconstrucción 3D a partir de la serie de secciones ópticas (ver video 3D-1). La flecha señala una partícula rodeada de CXCR4. La barra blanca representa  $5 \mu\text{m}$ . **B)** Reconstrucciones 3D especulares de una serie de secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal de una muestra de células CEM 1.3 contactando con partículas pseudovirales-GFP a  $16^{\circ}\text{C}$  en la que ya se aprecia una partícula entrando en la célula (ver video 3D-2). La flecha señala la partícula pseudoviral-GFP a ambos lados de la membrana celular. **C)** Reconstrucciones 3D de series de secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal de muestras de células CEM 1.3 incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  con partículas pseudovirales-GFP en las que se observan varios virus penetrando en la célula por una misma área de la membrana (ver video 3D-3 y 4, y secuencia del eje z correspondiente al video 3D-4).

A  $37^{\circ}\text{C}$ , temperatura permisiva para la entrada del virus, las partículas fusionaban su envuelta con la membrana plasmática introduciéndose rápidamente. El contacto de una partícula

con la célula inducía el reclutamiento de la maquinaria celular que el virus necesita para penetrar, lo que parecía convertir ese lugar en sitio óptimo para la entrada de otras partículas pseudovirales, ya que a menudo se veían numerosos virus contactando con la misma región de la membrana plasmática de la célula diana (**Figura 35C** y **Reconstrucciones 3D-3 y 4**; ver videos **3D-3**, **3D-4** y **Reconstrucción en el eje z**).

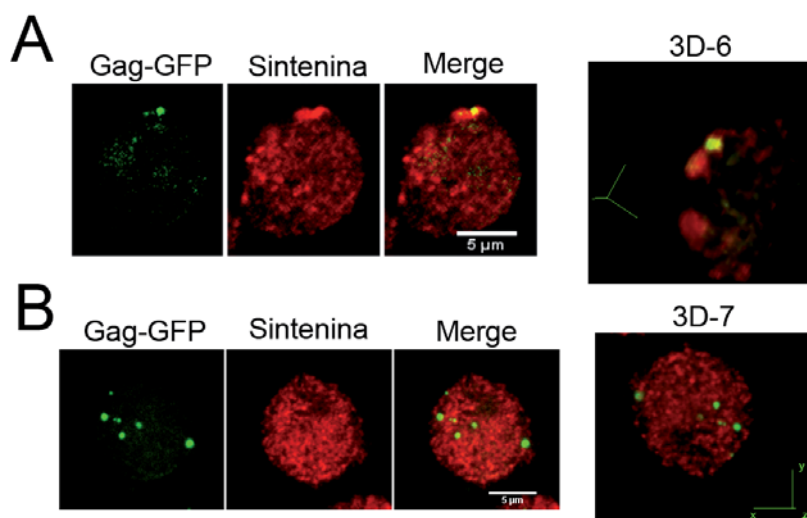
Dado que Sintenina-1 se reclutaba en los contactos con la envuelta viral (**Figura 32B**), quisimos observar si ésto también sucedía cuando la envuelta la portaba una partícula viral libre y no una célula. Para ello utilizamos partículas virales infecciosas con células diana transfectadas o no con Sintenina-GFP. Como se puede ver en la **Figura 36A** y **B**, tanto la Sintenina-1 endógena como la Sintenina-GFP se reclutaban al área de *capping*, junto con CD4 y CXCR4 en presencia de virus infecciosos (ver video **3D-5**).



**Figura 36**

**Capping de Sintenina-1 con CD4 en células CEM 1.3 incubadas con virus infecciosos NL4.3 a 37°C durante 30 min.** **A)** Proyección media de una serie de secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal y reconstrucción 3D de la serie (ver vídeo 3D-5). Se muestra el *capping* de una célula que ha contactado con virus en la que se ha teñido Sintenina-1 (usando el Ac anti-Sintenina-1 seguido de un Ac secundario GAR-488 y el Ac anti-CD4 T4 seguido de un Ac secundario GAM-568). La barra equivale a 5  $\mu$ m. **B)** Proyecciones máximas de series de secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal de células CEM 1.3 transfectadas con Sintenina-GFP e incubadas con partículas virales infecciosas. Una vez fijadas las muestras se tiñeron para CD4 o CXCR4 utilizando los Ac T4 o anti-CXCR4-biotinilado seguidos de un Ac secundario GAM-568. Las barras equivalen a 5  $\mu$ m.

Con las partículas pseudovirales-GFP se podía observar un reclutamiento específico y local de Sintenina-1 a la membrana durante el contacto con la envuelta viral (**Figura 37A** y video **3D-6**; 4°C). De nuevo, en ocasiones se veía una co-localización total de la partícula pseudoviral y Sintenina-1, y en otros casos, sólo una acumulación de Sintenina-1 alrededor de la partícula. Sin embargo, una vez que el virus penetraba en la célula, ya no se observaba ni co-localización ni reclutamiento de la Sintenina-1 con las partículas virales (**Figura 37B** y video **3D-7**; 37°C). Por tanto la envuelta del virus inducía el reclutamiento local de Sintenina-1 a la membrana sólo en las primeras fases de la entrada viral.



**Figura 37**

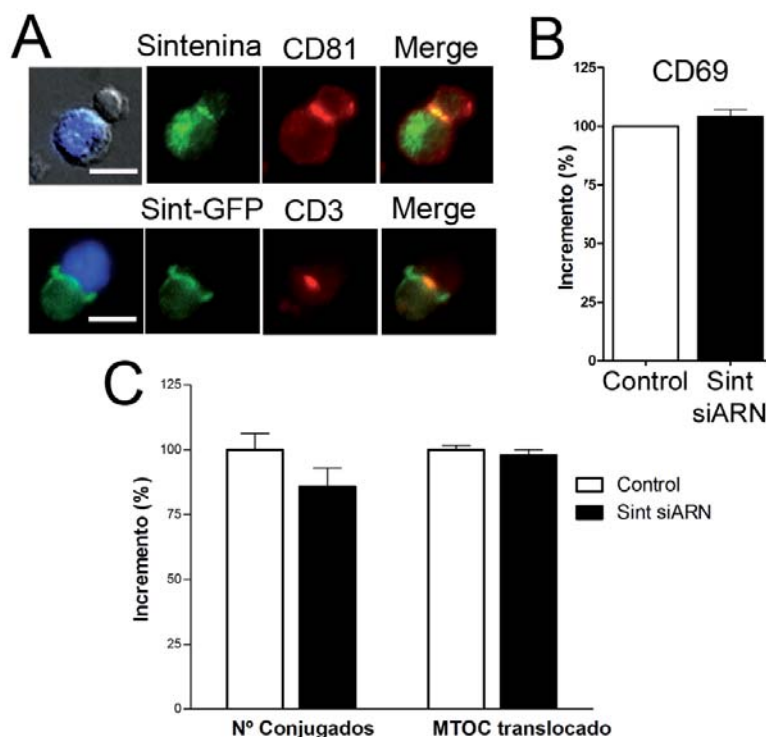
**Reclutamiento de la Sintenina-1 endógena a la membrana en la zona de contacto con la partícula pseudoviral-GFP (Gag-GFP).** **A)** Proyecciones medias de una serie de secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal de células CEM 1.3 incubadas con pseudopartículas virales-GFP a 4°C, fijadas y teñidas para Sintenina-1 usando el Ac anti-Sintenina-1 seguido del Ac secundario GAR-568. A la derecha se puede ver ampliada la zona de contacto entre la partícula pseudoviral y la célula en una reconstrucción 3D a partir de la serie de secciones ópticas anteriores (ver video 3D-6). La barra blanca representa 5 μm. **B)** Proyecciones medias de una serie de secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal de células CEM 1.3 incubadas con pseudopartículas virales-GFP a 37°C, fijadas y teñidas para Sintenina-1 usando el Ac anti-Sintenina-1 seguido del Ac secundario GAR-568. A la derecha se puede ver ampliada la zona de contacto entre la partícula pseudoviral y la célula en una reconstrucción 3D a partir de la serie de secciones ópticas anteriores (ver video 3D-7). La barra blanca representa 5 μm.

### 3.4 Sintenina-1 y la sinapsis inmune

La Sintenina-1 no se había implicado en el reconocimiento T-CPA anteriormente. Dadas las semejanzas entre las estructuras de la sinapsis viral y la sinapsis inmune, se realizaron experimentos para ver si esta proteína adaptadora que habíamos implicado en fusión celular e infección viral tenía algún papel en la interacción T-B y la posterior activación de la célula T.

La Sintenina-1 se localizaba en la sinapsis inmune ocupando tanto el cSMAC junto a CD81, como el pSMAC (**Figura 38A**). Esta misma relocalización se observaba para Sintenina-GFP durante este proceso (**Figura 38A**). A continuación quisimos saber si la interferencia de Sintenina-1 en las células T afectaba al reconocimiento antigénico T-B. Realizamos seis experimentos independientes donde contamos más de 100 conjugados T-B para cada condición (células T control o interferidas para Sintenina). Sin embargo, ni la expresión de CD69, marcador temprano de la activación de la célula T (**Figura 38B**), ni el número de conjugados, ni la translocación del centro organizador de microtúbulos (MTOC; reconocido como uno de los eventos que suceden rápidamente tras el reconocimiento antigénico) (**Figura 38C**) se veían afectados significativamente por la depleción de Sintenina-1.



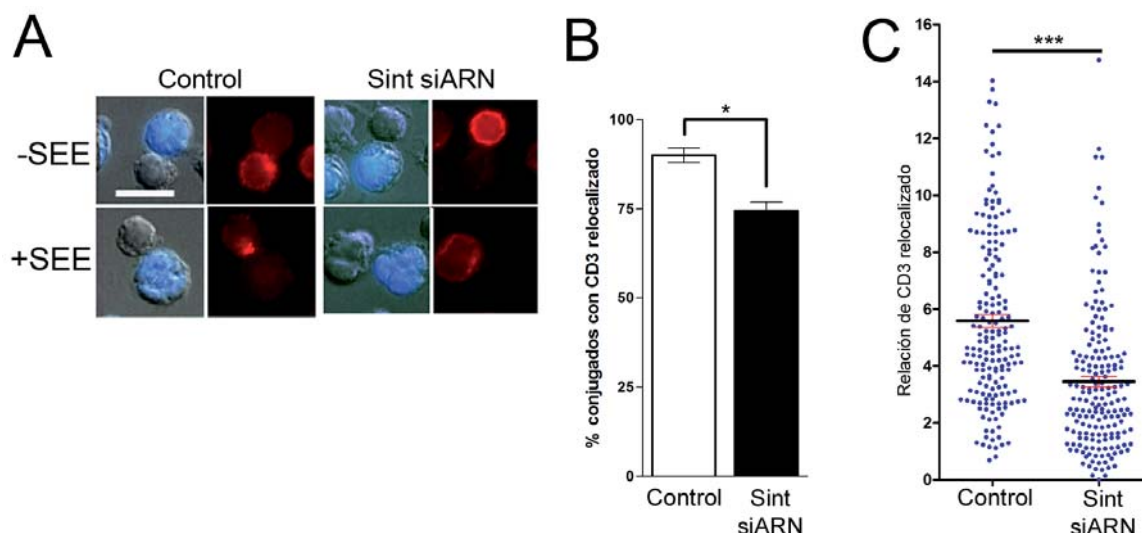


**Figura 38**

**Localización de Sintenina-1 en la sinapsis inmune.** **A)** Inmunofluorescencias mostrando el reclutamiento de la Sintenina-1 endógena (tiñendo con el Ac anti-Sintenina-1 seguido de un Ac secundario GAR-488) y la Sintenina-GFP en la sinapsis inmune formada durante el reconocimiento antigénico entre una célula T (Jurkat J77) y una célula B cargada con SEE (Raji marcada con una sonda intracelular azul). Además se tiñeron otras moléculas que se reclutan a la sinapsis inmune como CD81 (utilizando el Ac 5A6 seguido de un GAM-568) y CD3 (usando el Ac T3b seguido de un GAM-568). La barra equivale a 10  $\mu$ m. **B)** Cuantificación mediante citometría de flujo de la expresión de CD69 (usando el Ac TP1/55 seguido de un Ac secundario GAM-488) a las 24h tras la incubación conjunta de células J77 tranfectadas con el oligonucleótido negativo (Control) o con el oligonucleótido interferente para Sintenina-1 (Sintenina siARN) y células Raji cargadas con SEE. Los valores representados son las medias de cuatro experimentos independientes normalizados con respecto al control  $\pm$  SD. **C)** Cuantificación del número de conjugados T-B formados y del número de conjugados con el MTOC translocado hacia la sinapsis inmunológica en inmunofluorescencias de células J77 tranfectadas con el oligonucleótido negativo (Control) o con el oligonucleótido interferente para Sintenina-1 (Sintenina siARN) y células Raji cargadas con SEE. Ambos tipos celulares se incubaron juntos durante 15 min a 37°C antes de depositarse en cristales recubiertos con poli-L-Lisina. Las células Raji se marcaron con una sonda intracelular azul. El MTOC se tiñó usando el Ac anti-Tubulina seguido de un Ac secundario GAM-488. Los valores representados son las medias de seis experimentos independientes contando más de 100 conjugados T-B en cada experimento y normalizados con respecto al control  $\pm$  SD.

No obstante, el reclutamiento de CD3 al cSMAC durante la sinapsis inmune se veía alterado parcialmente. Parte de los conjugados formados entre células B cargadas con el superantígeno y las células T interferidas para Sintenina-1 mantenían una tinción para CD3 por toda la membrana (**Figura 39A**, cuantificado en la **Figura 39B**). Analizamos con ayuda del software de *ImageJ* la relocalización del CD3 a la sinapsis inmune en células interferidas o no para Sintenina. Con este software se obtiene la relación entre la intensidad de fluorescencia de CD3 en la zona de la sinapsis inmune con respecto a la intensidad de fluorescencia para dicha proteína en el resto

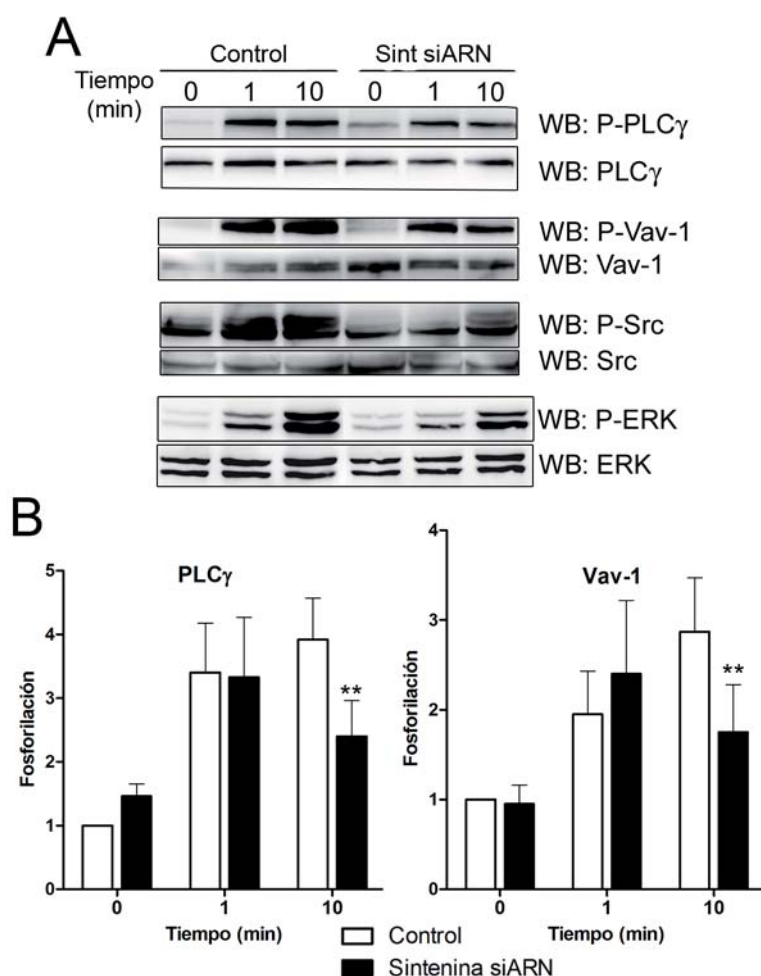
de la membrana plasmática de la célula T. Como se puede observar en la gráfica de la **Figura 39C** la población de conjugados con células T control tenía una media de relocalización de CD3 significativamente mayor que la de la población de conjugados con células T interferidas para Sintenina-1.



**Figura 39**

**Efecto de la interferencia de Sintenina-1 en el reclutamiento de CD3 a la sinapsis inmune.** **A)** Inmunofluorescencias mostrando el reclutamiento de CD3 (teñido con el Ac T3b seguido de un Ac secundario GAM-568) por parte de las células T J77 tranfectadas con el oligonucleótido negativo (Control) o con el oligonucleótido interferente para Sintenina-1 (Sintenina siARN) e incubadas con células Raji cargadas o no con SEE (marcadas con sonda intracelular azul). Ambos tipos celulares se incubaron juntos durante 15 min a 37°C antes de depositarse en cristales recubiertos con poli-L-Lisina. La barra equivale a 10 µm. **B)** Cuantificación del número de conjugados T-B que relocalizan CD3 hacia la sinapsis inmune en las inmunofluorescencias anteriores. Los valores representados son las medias de seis experimentos independientes contando más de 100 conjugados T-B en cada experimento y normalizados con respecto al control  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (*Test de Student's*). **C)** Cuantificación de la cantidad de CD3 relocalizado en la sinapsis inmune midiendo la relación de la intensidad de fluorescencia para CD3 en la sinapsis inmune con respecto a la intensidad de fluorescencia en el resto de la membrana de la célula T J77 mediante el *plug-in* "Synapses measures" del ImageJ. Los puntos representados son las relaciones de intensidad de fluorescencia en 200 conjugados T-B para cada condición. Las barras negras horizontales representan la media de los puntos en cada condición  $\pm$  SD. \*\*\* indica  $P < 0.0005$  (*Test de Student's*).

Dado que el CD3 es la señal principal de activación del linfocito T, la activación de las células T interferidas para Sintenina podía estar alterada. Para analizar el estado de activación de las células T tras reconocer el antígeno (superantígeno) se estudió la fosforilación de distintas moléculas señalizadoras de la ruta del TCR a distintos tiempos. Los resultados obtenidos muestran que mientras que Zap-70 se fosforilaba normalmente, otras proteínas como PLC $\gamma$ , Vav-1, Src, y ERK aunque se fosforilaban tras reconocer el antígeno, no mantenían su fosforilación a tiempos más prolongados, mostrando una menor fosforilación estadísticamente para PLC $\gamma$  y Vav-1 (ver tiempo 10 min en la **Figura 40A y B**).



**Figura 40**

**Efecto del silenciamiento de Sintenina-1 sobre la activación de la célula T.** **A)** Análisis por *Western-blot* mostrando la cinética de fosforilación para distintas moléculas señaladoras durante la activación del linfocito T tras el reconocimiento antigénico en lisados totales de conjugados T-B (relación 6:1). Las células J77 transfectadas con el oligonucleótido negativo (Control) o con el oligonucleótido interferente para Sintenina-1 (Sintenina siARN) se incubaron con células Raji presentando SEE durante el tiempo indicado. Se detectó en cada caso la proteína total y la fosforilada utilizando Ac específicos. **B)** Cuantificación de la relación de fosforilación para PLC $\gamma$  y Vav-1 en los tiempos indicados en las dos condiciones (J77 transfectadas con el oligonucleótido negativo (Control) o con el oligonucleótido interferente para Sintenina-1 (Sintenina siARN)). Los valores representados son las medias de cuatro experimentos independientes normalizados con respecto al Control (J77 transfectadas con el oligonucleótido negativo y tiempo 0 min)  $\pm$  SD. \*\* indica  $P < 0.005$  (*Test de Student's*).

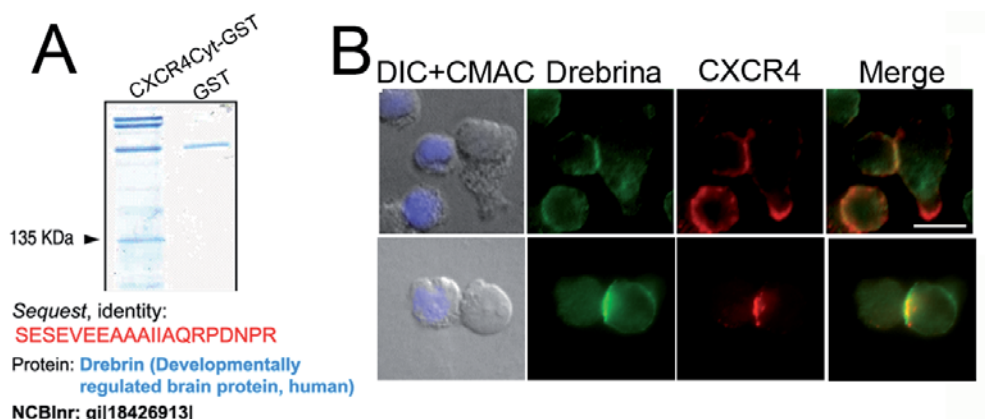
### 3.5 La Drebrina en la infección viral y la sinapsis inmune

La Drebrina es una proteína que se une a F-Actina, al igual que  $\alpha$ -Actinina, y que se detectó asociada a la región citoplasmática de CXCR4, co-receptor de VIH-1, mediante análisis proteómico (**Figura 41A**). Otras proteínas asociadas a CXCR4 obtenidas por análisis



proteómico como la Miosina IIA/B ya se habían implicado anteriormente en la infección viral [94].

Como observamos por inmunofluorescencia, la Drebrina se reclutaba a los contactos entre células T diana y células Env<sup>+</sup> junto a CD4 y CXCR4 (**Figura 41B, panel superior**). Además, durante la formación de la sinapsis inmune entre células B presentando superantígeno y células T, la Drebrina también se acumulaba en el contacto, concretamente en el pSMAC, junto con el anillo de F-Actina que se formaba en respuesta al reconocimiento T-B (**Figura 41B, panel inferior**).

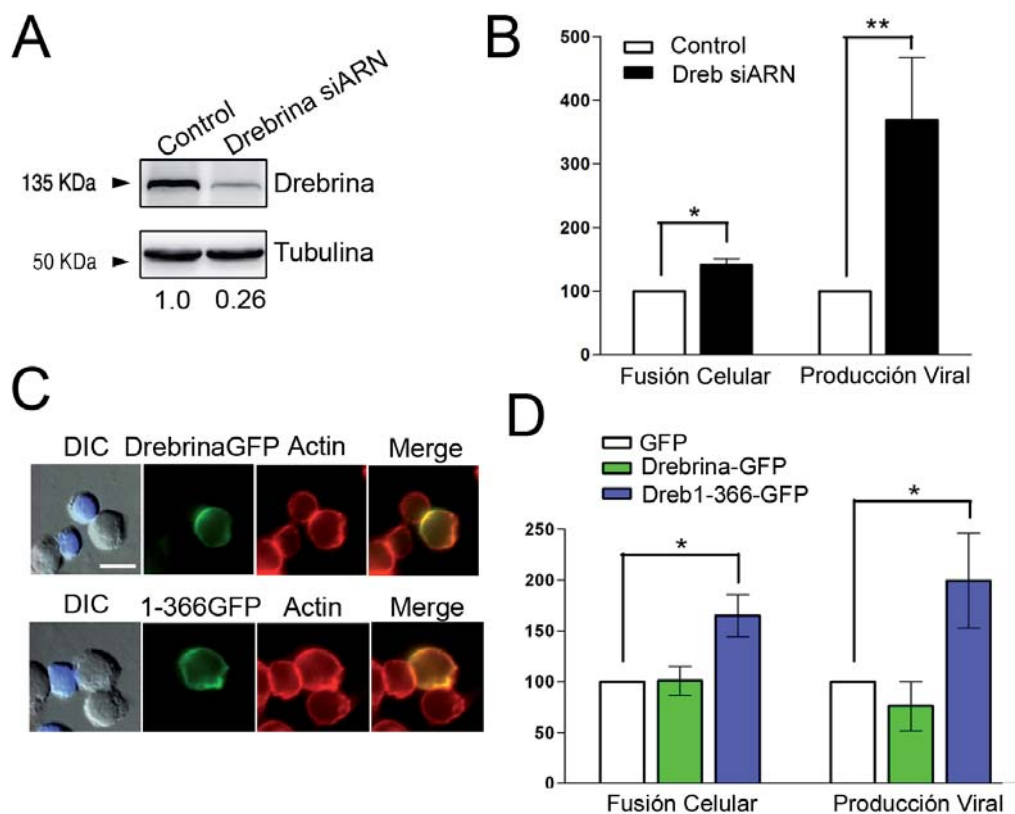


**Figura 41**

**Asociación de Drebrina con CXCR4 y localización de ambas proteínas en la sinapsis inmune y viral.** **A)** Pull-down de lisados de linfocitos T J77 con GST y CXCR4Cyt-GST (región citoplásmica de CXCR4 acoplada a GST) teñido con azul de Coomassie. La banda señalada de 135kDa se identificó posteriormente por espectrometría de masas como Drebrina. La banda inmediatamente superior es inespecífica y las de mayor peso molecular se identificaron como Miosina tipo II no muscular. **B)** Inmunofluorescencias mostrando la localización de Drebrina (teñida con el Ac anti-Drebrina de conejo seguido de un Ac secundario GAR-488) y CXCR4 (teñido usando el Ac anti-CXCR4-biotina seguido de un Ac secundario GAM-568) en células CEM 1.3 contactando con células Env<sup>+</sup> (marcadas con una sonda intracelular azul) durante 2 h a 37°C (panel superior) o células J77 conjugadas con Raji cargadas con SEE (marcadas con una sonda intracelular azul) (panel inferior). La barra blanca equivale a 10 µm.

A continuación procedimos a interferir la expresión de Drebrina usando una mezcla de oligos interferentes (ver Materiales y Métodos). La interferencia de Drebrina era máxima a las 24-48h y se mantenía durante al menos 72h (**Figura 42A**). La interferencia de Drebrina en células T diana facilitaba tanto la fusión celular inducida por la envuelta viral como la producción de virus a día tres (**Figura 42B**).

La sobreexpresión de Drebrina (Drebrina-GFP) sin embargo, no tenía efectos significativos en estos procesos (**Figura 42D**). En cambio, la sobreexpresión de un mutante truncado de Drebrina (aminoácidos del 1-366; Dreb 1-366) aumentaba la fusión celular y la infección por VIH-1 (**Figura 42D**). Este mutante mantiene su dominio de unión a actina y por tanto no se deslocaliza en el citoplasma, sino que conserva un patrón de distribución subcelular similar al de la Drebrina endógena y la Drebrina-GFP (**Figura 41B y 42C**). Sin embargo, en el caso de la Drebrina, aún manteniendo su capacidad de interactuar con la Actina, el efecto en ambos procesos virales es notable.

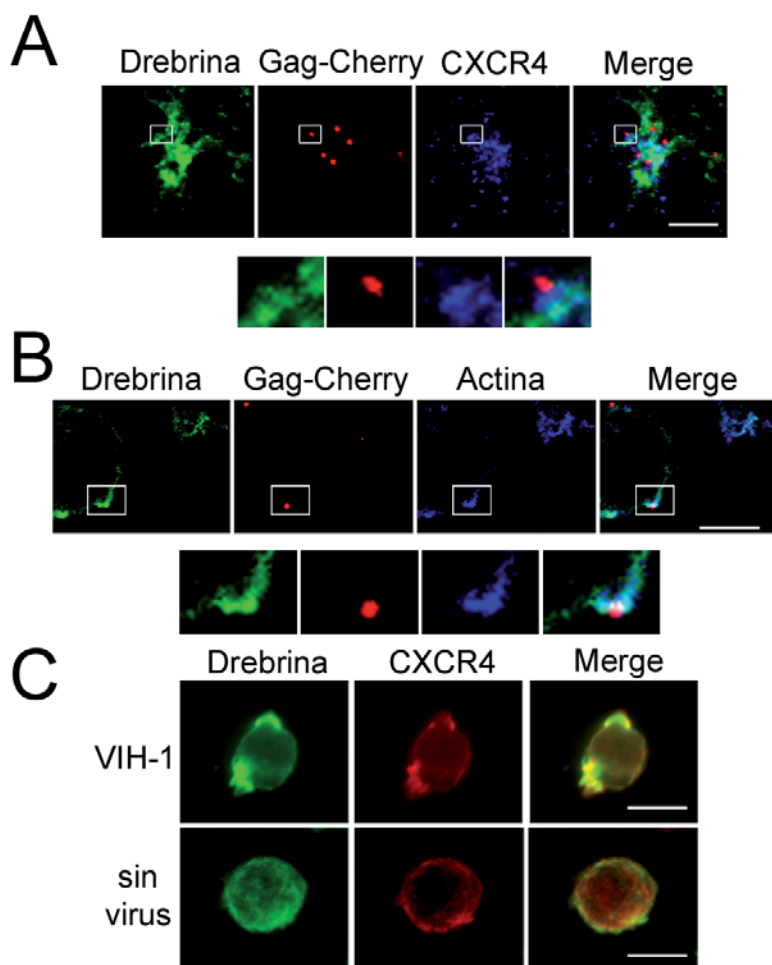


**Figura 42**

**Efectos funcionales de Drebrina en la transmisión del VIH-1.** **A)** Análisis por *Western-blot* en lisados celulares totales de células Jurkat J77 de la expresión de Drebrina en células control o interferidas para esta proteína a 24 h tras la transfección. La expresión de tubulina se analizó en las mismas muestras como control de carga. Los números representan la cuantificación de la banda de Drebrina referida a la banda de tubulina para cada carril y normalizados respecto al valor obtenido para las células control. **B)** Cuantificación de la formación de sincitios tras 16 h de co-cultivo por citometría de flujo y de la producción viral por ELISA de p24 en sobrenadantes de día 3 postinfección de células CEM 1.3 transfectadas con el oligonucleótido negativo (Control) o el oligonucleótido interferente para Drebrina (Drebrina siARN). Los valores representados son las medias de tres experimentos independientes por duplicado en el caso de la fusión celular y por triplicado en el caso de la producción viral, y normalizados con respecto a las células Control  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (*Test de Student's*); \*\* indica  $P < 0.005$  (*Test de Student's*). **C)** Inmunofluorescencias mostrando la distribución de las construcciones de Drebrina utilizadas (Drebrina-GFP y Drebrina 1-366GFP) en células CEM1.3 transfectadas con cada una de las construcciones y co-cultivadas durante 2 h a 37°C con células Jurkat Env<sup>+</sup> (marcadas con una sonda intracelular azul). Se tiñó además F-Actina utilizando faloidina-568. La barra representa 10  $\mu$ m. **D)** Cuantificación de la formación de sincitios tras 16 h de co-cultivo por citometría de flujo y de la producción viral por ELISA de p24 en sobrenadantes de día 3 postinfección de células CEM 1.3 transfectadas con Drebrina-GFP, Drebrina 1-366GFP o con el vector vacío (GFP). Los valores representados son las medias de cuatro experimentos independientes por duplicado en el caso de la fusión celular y por triplicado en el caso de la producción viral, y normalizados con respecto al control GFP  $\pm$  SD. \* indica  $P < 0.05$  (*Test de Student's*).

Por último, utilizando las partículas pseudovirales fluorescentes, analizamos la localización de Drebrina en las células T diana. Por microscopía confocal observamos el reclutamiento local de Drebrina a la zona de contacto entre la partícula pseudoviral y la célula (**Figura 43A y B**). En esta zona gp120 recluta también CXCR4 (**Figura 43B**). Este fenómeno

también se observó en la estructura de *capping* utilizando partículas virales infecciosas (**Figura 43C**). Aunque en este caso no se pueden visualizar las partículas virales, sí se apreciaba el reclutamiento de CXCR4 y Drebrina a un polo de la célula (**Figura 43C**).



**Figura 43**

**Localización de Drebrina en el contacto entre el virus y la célula.** **A)** Proyecciones medias de las series de secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal de muestras de CEM 1.3 incubadas con partículas pseudovirales (Gag-Cherry) a 4°C, fijadas y teñidas para Drebrina y CXCR4 (usando el Ac anti-Drebrina de conejo seguido del Ac secundario GAR-488 y el anti-CXCR4-biotina seguido del Ac secundario GAM-647). En los paneles inferiores se muestra un zoom 3x del recuadro blanco dibujado en las imágenes superiores, centrado en uno de los contactos partícula pseudoviral-célula. La barra blanca representa 5  $\mu$ m. **B)** Proyecciones medias de las series de secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal de muestras de CEM 1.3 incubadas con partículas pseudovirales (Gag-Cherry) a 4°C, fijadas y teñidas para Drebrina y F-Actina (usando el Ac anti-Drebrina de conejo seguido del Ac secundario GAR-488 y faloidina-647). En los paneles inferiores se muestra un zoom 4x del recuadro blanco dibujado en las imágenes superiores, centrado en uno de los contactos partícula pseudoviral-célula. La barra blanca representa 5  $\mu$ m. **C)** Proyecciones máximas de las series de secciones ópticas adquiridas mediante microscopía confocal donde se puede observar el *capping* provocado por partículas virales infecciosas NL4.3 en células CEM 1.3 (panel superior), y la distribución de CXCR4 y Drebrina en las áreas de *capping*. En ausencia de virus ambas moléculas se distribuyen homogéneamente por la membrana (en el caso de CXCR4) o subcorticalmente (en el caso de Drebrina) como se puede ver en el panel inferior. Las inmunotinciones se realizaron usando el Ac anti-Drebrina de conejo seguido del Ac secundario GAR-488 y el anti-CXCR4-biotina seguido del Ac secundario GAM-568. Las barras equivalen a 10  $\mu$ m.



## DISCUSIÓN

---



## DISCUSIÓN

### 1. LAS TETRASPANINAS Y LA FUSIÓN DE MEMBRANAS INDUCIDA POR LA ENVUELTA VIRAL

La fusión de membranas es un proceso importante para el funcionamiento de un organismo vivo. La vida comienza de hecho, con la fusión de un oocito y un espermatozoide durante la fertilización. Además, la fusión de membranas es necesaria para muchos otros procesos como la miogénesis, la osteogénesis, la formación de organelas, las rutas de endocitosis-exocitosis, etc.

Los virus son parásitos obligados que necesitan la maquinaria de una célula viva hospedadora para replicar. Estos seres han desarrollado diferentes estrategias evolutivas para entrar e infectar las células. El primer obstáculo que tienen que franquear los virus es la membrana plasmática celular. Esta membrana, barrera y nexo de la célula con el exterior, está altamente regulada y estructurada en microdominios especializados para la correcta comunicación de la célula con el entorno.

Los virus con envuelta traspasan la membrana celular mediante dos mecanismos: fusión dirigida por el reconocimiento de alta afinidad entre sus proteínas virales y un ligando celular, o bien, inducción de una señal de endocitosis al interactuar con un receptor celular. Ambos mecanismos precisan de un reconocimiento intermolecular específico y tienen como contrapartida la restricción de los tipos celulares susceptibles a ser infectados: sólo las células que tengan el ligando/receptor adecuado en su superficie son permisivas para la infección.

Del mismo modo, en organismos pluricelulares complejos, la comunicación entre distintos tipos celulares del mismo organismo se produce mediante el reconocimiento intermolecular de las proteínas presentes en el exterior de cada membrana celular. Este reconocimiento se traduce hacia el interior de cada célula regulando o generando una respuesta acorde. Uno de los procesos de intercomunicación celular más estudiado es el reconocimiento antigénico T-CPA durante el cual se forma la sinapsis inmune.

El escenario donde tienen lugar estos procesos, tanto fisiológicos como patogénicos, es siempre la membrana plasmática celular. Por tanto, aspectos físico-químicos de la membrana, como la fluidez, la rigidez, la densidad de proteínas y las asociaciones entre los distintos componentes de la membrana, pueden ser determinantes para el desarrollo de dichos eventos.

Con esta hipótesis de partida, nos dispusimos a analizar el papel de proteínas organizadoras de dominios de membrana y reguladoras del citoesqueleto de Actina cortical en la fusión celular inducida por la envuelta del VIH-1 y en la entrada del virus.

Todas las estrategias de transmisión que tiene el VIH-1 precisan del reconocimiento de CD4 y CXCR4/CCR5, moléculas expuestas en la membrana celular, por parte de la envuelta

viral (gp120/gp41). De este reconocimiento intermolecular derivan dos cuestiones importantes: el tropismo del virus y la cooperatividad del proceso.

### 1.1 El tropismo del virus y las tetraspaninas

El tropismo del virus VIH-1, determinado por el co-receptor que la envuelta viral es capaz de reconocer con alta afinidad, especifica el tipo celular permisivo para la infección. Al mismo tiempo, las señales que el virus induce según el co-receptor que utilice, definen distintos mecanismos de entrada del virus. Varios trabajos previos sugieren diferencias entre los mecanismos de entrada de virus T-trópicos y M-trópicos [95]. Aunque a grandes rasgos, la fusión de la envuelta y la membrana plasmática siga un proceso común, existen discrepancias entre tropismos que quizás sean las responsables de la distinta capacidad de transmisión de unas cepas y otras. Así, los virus M-trópicos suelen ser los más abundantes durante las primeras etapas de la enfermedad, y de hecho se les considera responsables de la diseminación de la enfermedad por vía sexual [96]. Sin embargo, los virus más infectivos y capaces de transmitirse formando sincitios suelen ser T-trópicos y aparecen al final de la etapa crónica de la enfermedad, una vez que el sistema inmune del individuo ya está muy deprimido [96, 97]. Con respecto al papel de las tetraspaninas en la infección por VIH-1 y el tropismo, se ha descrito que anticuerpos anti-CD63 inhiben la infección de virus M-trópicos pero no la de virus T-trópicos [23] y la incubación con proteínas recombinantes solubles del bucle extracelular largo (LELs) de distintas tetraspaninas reducen la infección en macrófagos pero no en linfocitos T [98]. Por tanto, el papel de las distintas tetraspaninas durante la infección parece ser diferente en función del tropismo de la envuelta viral.

De acuerdo con estas observaciones previas, nuestros resultados en el modelo celular HeLa donde empleamos envueltas de distinto tropismo, permiten ver diferencias en los efectos obtenidos al interferir CD9 o CD81 según la envuelta que utilicemos. El mayor efecto en la fusión celular inducida por la envuelta M-trópica (R5) se observa al reducir la expresión de CD9, mientras que para la envuelta T-trópica (X4) los efectos de CD9 y CD81 son similares. Coherentemente, los macrófagos, células permisivas para la infección de virus R5, expresan CD9 en su membrana, aumentando la expresión de esta tetraspanina a lo largo del proceso de diferenciación de monocito a macrófago [99].

El efecto en la formación de sincitios inducidos por la envuelta viral es más pronunciado en la línea T al silenciar CD81 o al preincubar con anticuerpos anti-CD81 que en la línea HeLa. Esto puede deberse a que estas células carecen de la tetraspanina CD9 y, por tanto, CD9 no puede compensar funcionalmente el defecto de CD81. En otros sistemas, como en la fusión del espermatozoide con el oocito, se ha demostrado una compensación funcional parcial entre CD9 y CD81, por lo que ambas tetraspaninas parecen tener funciones parcialmente redundantes [33].



## 1.2. La cooperatividad del proceso de fusión de membranas

A partir del propio modelo teórico de entrada del VIH-1, se deduce que la fusión de membranas debe ser un proceso cooperativo: lento en un principio, mientras cada trímero de proteínas virales encuentra e interacciona con moléculas de CD4 y CXCR4/CCR5, cambia de conformación e inserta los péptidos hidrofóbicos en la membrana diana, y rápido después, una vez que se alcanza una cierta densidad de proteínas virales insertadas en la membrana diana capaces de abrir un poro para fusionar las dos membranas. Chien y colaboradores refinan el modelo teórico vigente usando novedosas técnicas de microscopía de fluorescencia y demuestran que, aunque cada trímero es capaz de reconocer rápidamente CD4 y CXCR4 e insertar el péptido de fusión en la membrana diana (1 minuto), la formación del poro lleva unos 20 min, y sólo en los últimos min se produce rápidamente la fusión de membranas [100].

Los vídeos de la formación de sincitios y las imágenes y reconstrucciones de la entrada de partículas virales y pseudovirales parecen seguir la cinética propuesta por Chien y colaboradores. Si asumimos que ambos procesos ocurren de forma cooperativa, es fácil entender por qué los sincitios formados parecen predispuestos a fusionar de nuevo con otras células, y los lugares por donde entra un virus en la célula parecen ser vías preferentes para la entrada de otras partículas virales. Además, el fenómeno del *capping* observado desde hace varios años pero cuyo mecanismo se desconoce, podría deberse a este mismo efecto. El contacto de una partícula viral con una célula induce la relocalización de CD4 y el co-receptor a un polo de la célula, de forma que, aunque la célula contacte después con otras partículas, las que lo hagan en esa zona tendrán muchas más probabilidades de entrar en la célula diana. De este modo, la presencia de las tetraspaninas CD9 y CD81 podría estar dificultando el reclutamiento de CD4 y CXCR4 al contacto con la envuelta viral, dada su función organizadora de microdominios de proteínas en la membrana y la asociación constitutiva de CD4 y CD81 [27].

## 1.3. Las tetraspaninas CD9 y CD81 en el ciclo del VIH-1

En general, en la mayoría de los casos descritos en la bibliografía, las tetraspaninas regulan positivamente la fusión entre células y la formación de sincitios inducida por virus [101]. La expresión de CD9 es necesaria y suficiente para la infección por CDV (virus del moquillo canino) [102], aumenta la formación de sincitios entre mioblastos [32] y es esencial en la fertilización del oocito murino por el espermatozoide [103]. Sin embargo, en otros casos, las tetraspaninas tienen un efecto negativo en la fusión celular, por ejemplo la ausencia de CD9 y CD81 genera el desarrollo espontáneo de células multinucleadas gigantes en el pulmón del ratón [32].

Los efectos de los anticuerpos anti-tetraspaninas pueden ser debidos a su capacidad agonista o antagonista sobre la tetraspanina que reconozcan, así como a propiedades inherentes

a la inmunoglobulina (como la capacidad de entrecruzar proteínas debido a la bivalencia de los anticuerpos). Por tanto, los datos obtenidos utilizando anticuerpos anti-tetraspaninas pueden apuntar a un papel positivo o negativo de éstas en los distintos procesos analizados. Diversos anticuerpos anti-CD9 reducen la fusión celular en procesos como la formación de sincitios inducida por el CDV [22, 104], la salida de nuevos viriones de FIV (Virus de la Inmunodeficiencia Felina) [105], la fusión de células para dar lugar a los miotubos [32] y la osteoclastogénesis [106]. Anticuerpos anti-CD81 reducen la formación de sincitios inducida por HTLV-1 (Virus de la Leucemia T Humana-1) [30], bloquean la infección por VHC (Virus de la Hepatitis C) [107], y reducen la formación de miotubos [32]. Por otra parte, la incubación con anticuerpos anti-CD9 y anti-CD81 promueven la fusión de fagocitos mononucleares y macrófagos alveolares [34] y favorecen los contactos intercelulares (anticuerpos anti-CD9 facilitan la formación de conjugados entre monocitos y células T [108] y la incubación con anticuerpos anti-CD81 aumenta la colaboración T-B [18]).

En la fusión celular inducida por la envuelta del VIH-1, las tetraspaninas CD9 y CD81 parecen dificultar la formación de sincitios y la entrada de virus en las células diana. Todos los datos sobre CD81 obtenidos apuntan a que su presencia en la membrana obstaculiza la fusión de membranas que induce la envuelta viral. En primer lugar, al reducir su expresión la fusión celular y la infección aumentan. En segundo lugar, la sobreexpresión de CD81 inhibe ambos procesos. Por último, la sobreexpresión de la versión truncada en el dominio citoplasmático C-terminal de CD81 no tiene ningún efecto en la fusión celular y aumenta la infección por VIH-1. Este último resultado indica que CD81 ejerce un papel negativo en la fusión de membranas mediante su conexión citoplasmática, y además, que CD81 estaría implicado en etapas posteriores a la entrada viral de forma que compense el efecto negativo inicial.

Sin embargo, el mecanismo por el cual CD81 dificulta la fusión celular y la infección por VIH-1 es desconocido. Podría deberse a la regulación de CD81 sobre alguna de las integrinas asociadas a TEMs diferente de LFA-1, ya que tanto las células HeLa como las células T CEM 1.3 expresan bajos niveles de este receptor. Dado que se han co-inmunoprecipitado CD81 y CD4, el efecto observado podría deberse a un impedimento estérico para la asociación de CD4 y CXCR4 cuando CD81 está interaccionando con CD4. Teniendo en cuenta el papel organizador de microdominios de las tetraspaninas, ésta parece ser la explicación más coherente. Así, hipotéticamente, la expresión de CD81 en la membrana incluiría moléculas de CD4 en los TEMs, alejándolas de CXCR4.

Dado que todos los anticuerpos anti-tetraspaninas aumentan la fusión de membranas inducida por la envuelta del VIH-1, podría estar sucediendo que los anticuerpos estén entrecruzando tetraspaninas de ambos tipos celulares, favoreciendo así los contactos íntimos entre las células. Sin embargo, las imágenes de microscopía sugieren que las células diana incubadas con los anticuerpos anti-CD81 tienen acúmulos en la membrana que aglomeran moléculas de CD81, CD4 y CXCR4 incluso antes de entrar en contacto con las células Env<sup>+</sup>. A

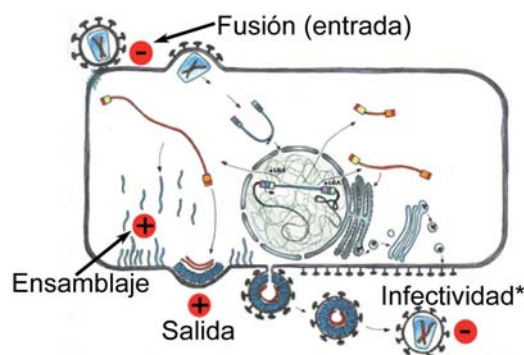
favor de este mecanismo existe otro artículo que demuestra que el aumento en la infección por VIH-1 X4 que produce el capsianósido G se debe a su capacidad de favorecer la co-localización de CD4 y CXCR4 facilitando el *capping* de estas moléculas por la envuelta viral [109]. Otra explicación posible sería el papel agonista que tiene el anticuerpo 5A6 al menos con respecto al nivel de activación del linfocito T vía PKC [31]. Ciertamente, en nuestro sistema, el anticuerpo 5A6 coopera con el anticuerpo activador OKT3 (anti-CD3) en el aumento de los niveles de infección de linfoblastos T. Se ha descrito anteriormente que los linfocitos activados se infectan más fácilmente [110], de modo que, la activación inducida por el anticuerpo podría predisponer a la célula a la fusión de membranas inducida por la envuelta viral.

Recientemente, otros grupos han analizado el papel de CD81 en el ciclo del VIH-1 desde otras perspectivas, completando y confirmando nuestro conocimiento sobre la implicación de esta tetraspanina en la infección viral. Así, hoy en día sabemos que la interferencia de CD81 en las células Env<sup>+</sup> también aumenta la fusión celular con células diana no interferidas, mientras que la sobreexpresión tiene el efecto contrario [111]. Además, el silenciamiento de CD81 reduce la salida de nuevos viriones [112] pero aumenta la infectividad de los mismos [112, 113]. Del mismo modo, los virus que emergen de células sobreexpresando CD81 y otras tetraspaninas son menos infectivos [114]. Estos datos en conjunto abogan por la implicación de CD81 en varias etapas del virus, teniendo un papel negativo en la fusión de membranas, tanto en la entrada viral inicial como en la formación de sincitios y en la infectividad de generaciones sucesivas de virus, y un papel positivo en etapas post-entrada como el ensamblaje y la salida de nuevos virus. Todos estos artículos ayudan a entender los resultados obtenidos en nuestro estudio al expresar la proteína CD81 completa o trunca para su región citoplasmática C-terminal. Así, deducimos que el papel regulador de CD81 en las distintas etapas del ciclo del VIH-1 precisa de la región citoplásmica C-terminal de esta tetraspanina ya que al expresar la forma trunca de CD81 perdemos la inhibición de la fusión celular que sí conseguimos al expresar la proteína CD81 completa. Del mismo modo, la expresión de la proteína de CD81 trunca anula el efecto compensatorio del papel modulador positivo de CD81 en etapas post-entrada de manera que sí se ve una inhibición en la producción viral que desaparece cuando expresamos la proteína CD81 completa (Figura 44).

De acuerdo con las observaciones anteriores, se ha descrito que los niveles de expresión de CD81 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> crónicamente infectados o de pacientes son menores que los basales, lo que sugiere que el VIH-1 es capaz de reducir los niveles de esta proteína una vez ha infectado una célula para maximizar la infectividad de los nuevos virus [114, 115].

Por otra parte, se ha demostrado recientemente que los nuevos virus se ensamblan y emergen de zonas de la membrana ricas en CD81 [116]. Asimismo, la proteína estructural del virus, *Gag*, interacciona directa o indirectamente con esta tetraspanina [112]. Es más, la reducción de los niveles de CD81 en células infectadas con VIH-1 supone la dispersión de la proteína *Gag* por toda la membrana plasmática en lugar de acumularse en uno de los polos de

la célula como ocurre normalmente [112]. Por tanto, la interacción de CD81 con *Gag* parece definir el lugar de ensamblaje de los nuevos virus.



**Figura 44.**

**Etapas del ciclo del VIH-1 en las que se ha implicado a la tetraspanina CD81.** Los símbolos rojos indican el efecto modulador positivo o negativo de CD81 en cada paso del ciclo viral. Imagen modificada a partir de [www.mayoresearch.mayo.edu](http://www.mayoresearch.mayo.edu)

#### 1.4 Implicación de EWI-2, receptor asociado a CD9 y CD81, en la transmisión del VIH-1

EWI-2 se describió como una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se unía directa y muy estrechamente a las tetraspaninas CD9, CD81 y CD82 [35, 36]. Dentro de los TEMs, EWI-2 interacciona con distintas integrinas regulando su función [37, 38]. Además, recientemente se ha descrito que una forma proteolizada de EWI-2, EWI-2wint, es capaz de inhibir la unión del VHC a CD81 [92].

Dado que EWI-2 interacciona por su región citoplasmática con ERM s [7] y  $\alpha$ -Actinina, puede estar conectando los TEMs con el citoesqueleto de Actina cortical. Por otro lado, recientemente se ha descrito que el contacto con la envuelta de VIH-1 provoca la fosforilación de las ERM s, activándolas [117]. Es más, la sobreexpresión de la ERM más expresada en linfocitos T, Moesina, favorece la fusión celular, la producción viral y la entrada del VIH-1 X4 trópico, mientras que la interferencia o la sobreexpresión de un dominante negativo de Moesina (N-Moesina) reduce estos procesos [117]. Estos efectos se deben a que Moesina es capaz de favorecer el agrupamiento de CD4 y CXCR4 durante el *capping* inducido por la envuelta X4 viral [117].

En nuestro estudio hemos observado que al reducir los niveles de EWI-2 se produce una mayor fusión celular y producción viral. De acuerdo con los resultados de Barrero-Villar y colaboradores, al interferir EWI-2 podríamos aumentar indirectamente el número de moléculas de Moesina desocupadas y por tanto, libres para entrecruzar CD4 y CXCR4 vía F-actina y facilitar el *capping* de receptores. Otra posible explicación sería que la interferencia de EWI-2 provocase una menor asociación de CD81 con CD4, lo que a juzgar por los resultados obtenidos para la interferencia de CD81, parece facilitar la entrada viral. Se ha demostrado en

otros sistemas que EWI-2 puede modular la asociación de CD81 con algunas integrinas y su localización subcelular [37, 38]. Por tanto, la presencia de EWI-2 en la membrana plasmática podría favorecer la asociación de CD81 y CD4 y viceversa. Por último, el efecto de EWI-2 podría deberse a su conexión con  $\alpha$ -Actinina, ya que la reducción de la expresión de ambas proteínas tiene las mismas consecuencias sobre la producción viral.

## 2. EL CITOESQUELETO Y LA INFECCIÓN POR VIH-1

Desde hace unos años se sabe que el citoesqueleto de Actina y Tubulina están implicados en varias etapas del ciclo de infección del VIH-1.

Desde el primer artículo de Iyengar y colaboradores hace una década, describiendo el papel de la F-Actina en el *capping* de receptores, numerosos artículos han completado el conocimiento sobre la implicación del citoesqueleto de Actina en la transmisión del VIH-1. Así, sabemos que la polimerización de Actina interviene también en la transmisión del virus por formación de sincitios [60] y en la trans-infección entre células dendríticas portadoras del virus y linfocitos T [118].

Aún así, la mayoría de los trabajos publicados recurrían a la utilización de drogas que estabilizaban o disgregaban los filamentos de Actina y/o Tubulina. Recientemente, y gracias al desarrollo de nuevas tecnologías, se conoce más sobre la regulación de la Actina por parte del VIH-1. La envuelta viral parece ser la principal responsable de los cambios que se producen en el citoesqueleto de Actina de la célula diana [119]. Al contactar con la célula, la envuelta viral genera señales intracelulares a través de CD4 y CXCR4. Inicialmente se produce una polimerización de Actina masiva y polarizada hacia el contacto virus-célula. Además, la envuelta induce la producción local de fosfoinosítidos (activando quinasas como PI4K-I $\alpha$  por un mecanismo todavía no descrito) lo que promueve la activación de proteínas como las ERMs [117]. Otras señales derivadas del contacto de la envuelta con CD4 y CXCR4 inducen la unión de Filamina, proteína entrecruzadora de F-Actina, con CD4 y CXCR4, y la inactivación de Cofilina (proteína despolimerizadora de filamentos de Actina) [120]. Todos estos cambios se traducen en el reclutamiento eficaz de la mayoría de las moléculas de CD4 y CXCR4 al sitio de contacto con la envuelta viral. Sin embargo, es sabido que la polimerización masiva de Actina cortical dificulta el paso de estructuras como gránulos y vesículas. Por tanto, el engrosamiento de Actina en la zona de anclaje del virus podría dificultar la entrada de la cápside una vez formado el poro de fusión. Esto explicaría por qué Campbell y colaboradores observaron que la despolimerización de Actina después de la entrada del virus tenía un efecto positivo sobre la infectividad del virus [121]. En efecto, ahora sabemos que poco después de la reestructuración local de CD4, CXCR4 y el citoesqueleto de actina, la envuelta viral es capaz de activar la despolimerización local de Actina mediante señales derivadas de su unión a CXCR4 que llevan a la activación de Cofilina [122].

## 2.1 Efecto de $\alpha$ -Actinina en la transmisión del VIH-1

La proteína  $\alpha$ -Actinina está implicada en la unión de moléculas de adhesión como integrinas y ligandos de integrinas, con el citoesqueleto cortical de Actina. Su función entrecruzadora de F-Actina y moléculas transmembrana está regulada por su unión a distintos fosfoinosítidos [42]. Recientemente, varios trabajos han relacionado directamente distintas isoformas de  $\alpha$ -Actinina con la migración y la adhesión de linfocitos y células de carcinoma [43, 123, 124]. Es más, Mazzoca y colaboradores describen la interacción funcional de la tetraspanina CD81 con la quinasa de fosfoinosítidos-4 de tipo II (PI4K-II) y  $\alpha$ -Actinina en células tumorales. Así, la interferencia de CD81 o de PI4K-II aumenta la migración celular y la capacidad metastática de estas células. La administración de fosfoinosítidos, que inhiben la unión de  $\alpha$ -Actinina a la F-Actina, revierte el efecto de la interferencia de PI4K-II, demostrando que es la función catalítica de esta enzima la responsable del efecto de la interferencia sobre la migración celular [42]. Por tanto, las proteínas CD81, PI4K-II y  $\alpha$ -Actinina regulan negativamente la capacidad migratoria de estas células tumorales. En nuestro estudio observamos por análisis proteómico que esta interacción funcional entre CD81 y  $\alpha$ -Actinina se corresponde con una interacción molecular directa entre ambas proteínas e indirecta vía EWI-2 en linfocitos T.

Por otro lado, recientemente se ha implicado otra quinasa de fosfoinosítidos en la infección por VIH-1: PI4K-I $\alpha$  [125]. En este trabajo, Barrero-Villar y colaboradores demuestran que la envuelta del VIH-1 induce la formación de PIP2 y que la interferencia de la quinasa PI4K-I $\alpha$ , principal productora de este fosfoinosítido, bloquea la infección viral.

Por tanto, la generación de PIP2 que induce el contacto con la envuelta viral vía PI4K-I $\alpha$  podría regular negativamente la unión de  $\alpha$ -Actinina a F-Actina y EWI-2, en favor de la conexión vía ERMs, lo que favorece la infección viral. El virus así, induciendo un solo mensajero secundario, sería capaz de reestructurar el citoesqueleto de Actina y sus conexiones con proteínas transmembrana.

De acuerdo con esta hipótesis, nuestros resultados muestran cómo la interferencia de  $\alpha$ -Actinina-1 ó 4, y la sobreexpresión de un mutante de esta proteína incapaz de unirse a F-Actina favorecen la infección por VIH-1. El mutante de  $\alpha$ -Actinina que no une F-Actina podría asemejarse con la inhibición de la unión de  $\alpha$ -Actinina a F-Actina por PIP2, de forma que en ambos casos se produce un aumento en la infección viral.

Sería interesante observar si en linfocitos T, CD81 se asocia a alguna de las PI4K y si esta interacción tiene algún efecto sobre la infección por VIH-1. Aunque carecemos del dato directo, sí se conoce que tanto la interferencia de CD81 como la de PI4K-I $\alpha$  tienen el mismo efecto favorecedor sobre la infección viral.



## 2.2 Sintenina-1 en el ciclo del VIH-1 y la sinapsis inmunológica

Sintenina-1 es una proteína adaptadora capaz de interactuar con distintas proteínas y receptores transmembrana. Al mismo tiempo, esta proteína también interactúa con PIP2 para lo que precisa de sus dos dominios PDZ. Es más, el sitio de unión de PIP2 se superpone con el sitio de unión de otras proteínas asociadas a Sintenina-1, con lo que la unión del fosfoinosítido podría desplazar la interacción de Sintenina-1 con otras proteínas a las que se asocia [45].

Por tanto, el contacto de la célula con la envuelta viral y la subsiguiente generación de PIP2 podría estar forzando la desunión de Sintenina-1 a CD4 y quizás así, favorecer el reclutamiento de CD4 a la zona de contacto con el virus o la célula infectada. De este modo, se puede deducir que la interferencia de Sintenina-1 tendría el mismo efecto sobre CD4, lo que explicaría por qué favorece la fusión celular y la producción viral. La sobreexpresión de Sintenina-1 tendría el efecto contrario, más moléculas de CD4 se asociarían con Sintenina-1, y esta proteína podría anclarla a microdominios enriquecidos en tetraspaninas dado que interactúa con tetraspaninas como CD63.

Recientemente se ha descrito la función reguladora negativa sobre la infectividad de VIH-1 para otras proteínas PDZ. El silenciamiento de la proteína PDZ Dlg-1 (*Discs Large*) aumenta la infectividad de los nuevos virus y la sobreexpresión de Dlg-1 la reduce [126]. Sin embargo, la implicación de esta proteína en el ciclo del VIH-1 se debe a su capacidad de interactuar con la proteína *Gag* y alterar su localización subcelular, afectando así a las últimas etapas del ciclo viral.

El reconocimiento entre el virus y la célula, o entre dos células (en procesos patológicos o fisiológicos) parece precisar en muchos casos de moléculas auxiliares de adhesión que aseguren el contacto íntimo entre las partes implicadas en el reconocimiento. Como consecuencia, la membrana plasmática sufre una reorganización de sus proteínas dando lugar a estructuras muy definidas conocidas como sinapsis [57, 86].

Tanto la sinapsis inmune como la sinapsis viral tienen en común muchas características [84, 87]. Se estructuran en dos anillos concéntricos: el central con las moléculas directamente implicadas en el reconocimiento, y el periférico con moléculas de adhesión y citoesqueleto de Actina. Igualmente, las células implicadas en ambos procesos son las mismas en muchos casos, linfocitos T y células presentadoras de antígenos. Muchos virus, en especial el VIH-1, han evolucionado para aprovechar estructuras con funciones fisiológicas para su transmisión induciendo pequeños cambios en ellas.

Por todo esto, muchas de las proteínas que se describen implicadas en alguna de las dos estructuras, acaban teniendo funciones en la otra. Esto es evidente para CD4, molécula implicada en el reconocimiento antigénico y receptor del VIH-1. Otras evidencias a favor de esta hipótesis son LFA-1 e ICAM-1, proteínas de adhesión presentes en el pSMAC de la sinapsis inmune [18] e implicadas en la transmisión del VIH-1 por diferentes vías [62, 77, 91, 127].

Siguiendo este razonamiento, distintos trabajos de nuestro laboratorio demuestran que lo mismo ocurre con proteínas como CD81 [25, 128], EWI-2,  $\alpha$ -Actinina, Sintenina-1, y Drebrina.

### 2.3 Drebrina y el VIH-1

Los efectos que observamos al alterar la expresión de Drebrina, proteína implicada en la dinámica del citoesqueleto de Actina, pueden deberse a señales inducidas por la envuelta viral a través de CXCR4. La interferencia de Drebrina podría facilitar la interacción de CXCR4 con otras moléculas adaptadoras o señalizadoras más convenientes para la entrada del virus en la célula o la formación de sincitios. Su sobreexpresión y su capacidad de asociarse a la región citoplasmática de CXCR4 podrían estar dificultando la inducción de señales por parte de la envuelta viral a través de CXCR4. En el caso del truncado de Drebrina 1-366, desconocemos la razón por la que aumenta la fusión celular y la producción viral. Sin embargo, los últimos experimentos muestran una mayor capacidad de unión de este truncado con CXCR4, por lo que el extremo N-terminal de la proteína parece ser un regulador negativo de la asociación de Drebrina con CXCR4. Quedan por determinar las consecuencias de la unión de Drebrina a CXCR4 con respecto a la polimerización/despolimerización de Actina.

Por otro lado, resultados recientes de nuestro laboratorio demuestran que el silenciamiento tanto de Drebrina como de Sintenina-1 bloquean la polimerización de Actina en respuesta a estímulos activadores de linfocitos T como anticuerpos anti-CD3 o inductores de la migración quimiotáctica como SDF-1 $\alpha$  (ligando de CXCR4) y MIP-1 $\alpha$ . Por tanto, la interferencia de estas moléculas tiene una clara consecuencia sobre la dinámica del citoesqueleto de Actina, no sólo durante procesos virales sino en la respuesta fisiológica del linfocito T frente a distintos estímulos.

Nuevos estudios utilizando técnicas microscópicas de alta resolución han permitido observar el paso de partículas virales de VIH-1 de unas células a otras a través de largos filopodios, denominados nanotubos, ricos en filamentos de Actina [129]. Esta forma de transmisión del virus depende también de CD4 y se bloquea con el péptido T20, por lo que parece precisar de eventos de fusión de membranas dirigidos por la envuelta viral del mismo modo que la entrada de virus libres o la formación de sincitios. Estas nuevas tecnologías están permitiendo observar también los movimientos de los virus dentro de la célula y su asociación con el citoesqueleto de Actina [75, 130].

Por último, algunos artículos han demostrado que la dinámica de los microtúbulos también puede afectar al ciclo del VIH-1 [131, 132].

En resumen, la dinámica del citoesqueleto de la célula diana afecta al ciclo del VIH-1, por lo que este virus ha desarrollado distintas estrategias para modularlo y utilizarlo en su provecho.



## 2.4 Visión global de la organización molecular de la membrana y el citoesqueleto de Actina inducida por el VIH-1

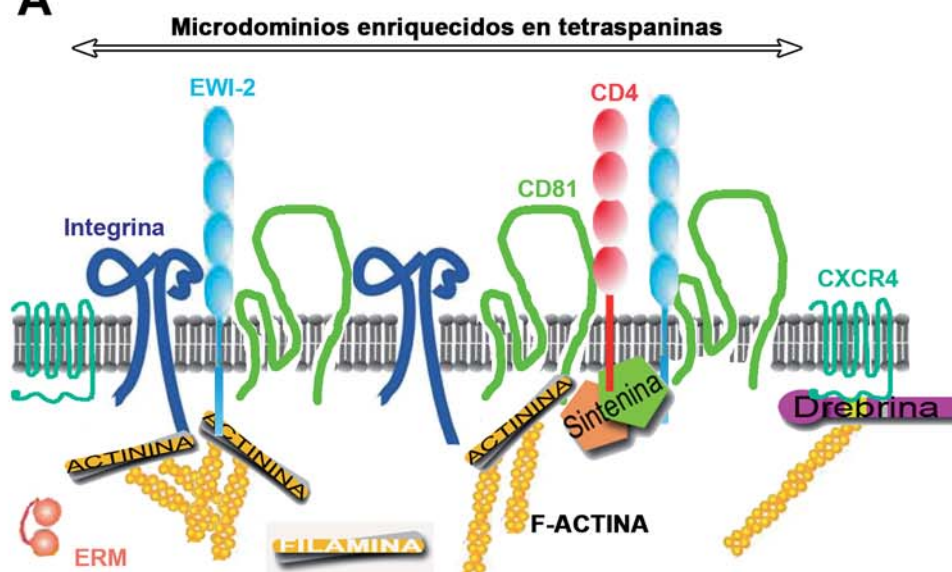
Integrando los datos descritos en la bibliografía y los obtenidos durante este estudio, proponemos el siguiente modelo de reorganización de las moléculas implicadas en la entrada viral (**Figura 45**).

En la situación inicial, previa al contacto con el virus, la membrana de una célula T está organizada en distintos microdominios especializados. Los microdominios enriquecidos en tetraspaninas (TEMs) incluyen CD81, EWI-2, integrinas y otras proteínas asociadas como CD4 [27]. Estos TEMs, a su vez, están conectados con el citoesqueleto de Actina vía  $\alpha$ -Actinina (asociada a integrinas, EWI-2 y CD81). Otras moléculas entrecruzadoras de filamentos de Actina están inactivas en el citosol como ERM y Filamina. CXCR4 se encuentra alejado de CD4, debido a la asociación de CD4 con CD81. Hipotéticamente, CD4 estaría interaccionando con Sintenina-1 y CXCR4 con Drebrina (**Figura 45A**).

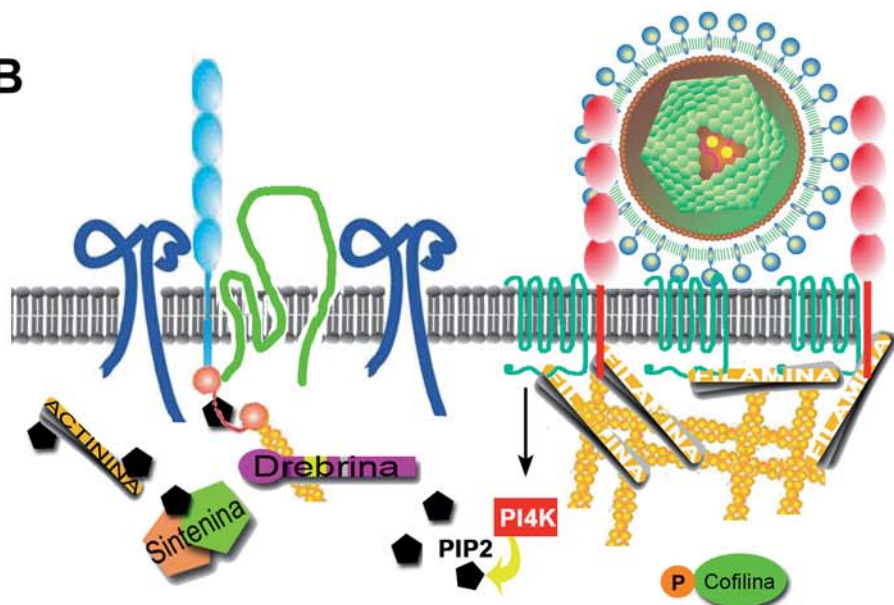
Al contactar la célula diana con el virus a través de CD4 y CXCR4, se produce un agrupamiento de estas moléculas debido a la polivalencia de los trómeros de la envuelta viral. De estas interacciones (gp120 con CD4 y CXCR4) se derivan una serie de señales intracelulares que llevan a la activación de PI4K y la consecuente producción de PIP2 [125]. Esta señal provoca varios cambios: la activación de las ERM que se unen a EWI-2/CD81 y F-Actina, la desunión de Sintenina-1 de la región citoplasmática de CD4, la disociación de  $\alpha$ -Actinina de las regiones citoplasmáticas de CD81 y EWI-2, y quizás también la desunión de Drebrina de la región citoplasmática de CXCR4. Así, CD4 y CXCR4 se enlazan ahora con el citoesqueleto de Actina vía Filamina [120], lo que favorece el agrupamiento de receptor y co-receptor del virus en la proximidad del contacto viral, mientras que las tetraspaninas y moléculas asociadas (EWI-2) se conectan con el citoesqueleto de Actina vía ERM [7,117]. Además de la conexión vía Filamina del receptor y el co-receptor del virus, se bloquea la despolimerización de Actina inhibiendo cofilina [120] generando un enriquecimiento local de F-Actina. Este hipotético cambio en las moléculas conectoras entre las proteínas transmembrana y los filamentos de Actina podría ser el responsable de la segregación de CD4/CXCR4 y CD81/EWI-2 en plataformas diferenciadas dentro de la membrana plasmática tras el contacto con el virus (**Figura 45B**).

Por último, señales más tardías inducidas por el virus vía CXCR4 promueven la desfosforilación de Cofilina y por tanto activan su capacidad despolimerizadora de F-Actina [119]. La despolimerización local de Actina permitiría desarmar el entrecruzamiento de filamentos de Actina para facilitar la entrada de la cápside viral en el citoplasma [122] (**Figura 45C**).

**A**



**B**



**C**

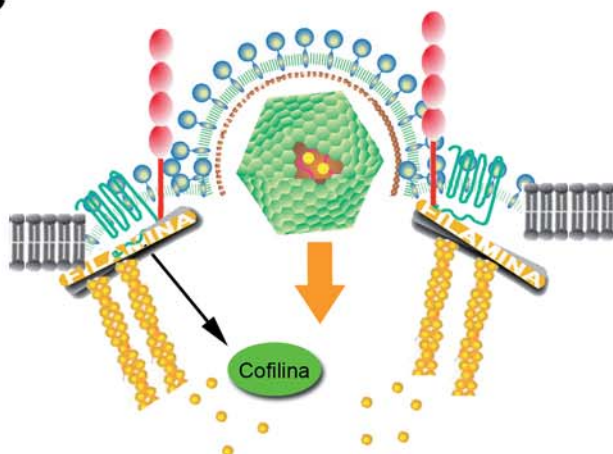


Figura 45. Modelo final propuesto.

## CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. El proceso de fusión celular inducida por la envuelta viral y el contacto de la célula diana con una partícula viral libre promueven un reclutamiento específico de proteínas transmembrana (tetraspaninas y EWI-2), adaptadoras (Sintenina-1) y reguladoras del citoesqueleto cortical de Actina ( $\alpha$ -Actinina y Drebrina) en un polo de la célula. Este polo se convierte en lugar preferente para la entrada de otros virus, por lo que puede decirse que ambos procesos son cooperativos.

2. Las tetraspaninas CD9 y CD81 y la molécula asociada a ellas EWI-2 dificultan la entrada viral y la fusión de membranas, como se deduce de los estudios realizados silenciando y sobreexpresando estas moléculas. CD81 y EWI-2 parecen precisar de su dominio citoplasmático C-terminal para ello, probablemente por su capacidad de interactuar con proteínas conectoras con el citoesqueleto de Actina como  $\alpha$ -Actinina. La delección del dominio citoplasmático de EWI-2 tiene un efecto similar a su silenciamiento por lo que parece actuar como un dominante negativo.

3. CD81 además, está implicado en otras etapas del ciclo viral donde favorece la generación de nuevos viriones, por lo que su silenciamiento/sobreexpresión tiene un efecto global menor en la producción viral total.

4. El silenciamiento de  $\alpha$ -Actinina, así como la sobreexpresión de un mutante que no puede unirse a Actina, aumentan la infección viral.  $\alpha$ -Actinina por tanto, media conexiones entre la membrana y el citoesqueleto de Actina que desfavorecen la entrada viral.

5. La Sintenina-1 interactúa con la región citoplasmática de CD4, receptor de VIH-1 y su silenciamiento aumenta la infección viral y la fusión celular inducida por la envuelta. Asimismo, la sobreexpresión de Sintenina-1 tiene el efecto contrario en ambos procesos. De este modo, la presencia de Sintenina-1 en la zona de contacto con el virus dificulta la fusión de membranas inducida por la envuelta viral.

6. La Sintenina-1 se recluta a la sinapsis inmunológica durante la presentación antigénica. La interferencia de Sintenina-1 inhibe parcialmente la relocalización del CD3 al cSMAC y reduce la fosforilación de proteínas de señalización del linfocito T, por lo que Sintenina-1 está implicada en la activación de la célula T en respuesta a antígeno.

7. La Drebrina interactúa con la región citoplasmática de CXCR4, co-receptor de VIH-1 y su silenciamiento aumenta la infección viral y la fusión celular inducida por la envuelta. La expresión de una forma truncada para su región C-terminal, produce el mismo efecto que el silenciamiento de la Drebrina endógena aunque este mutante de delección mantiene el dominio de interacción con F-Actina y es capaz de unirse a CXCR4.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---





## BIBLIOGRAFÍA

1. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(23): p. 720-31.
2. Hancock, J.F., *Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(6): p. 456-62.
3. Yanez-Mo, M., et al., *Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes*. Trends Cell Biol, 2009.
4. Seigneuret, M., *Complete predicted three-dimensional structure of the facilitator transmembrane protein and hepatitis C virus receptor CD81: conserved and variable structural domains in the tetraspanin superfamily*. Biophys J, 2006. **90**(1): p. 212-27.
5. Levy, S. and T. Shoham, *The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(2): p. 136-48.
6. Hemler, M.E., *Tetraspanin functions and associated microdomains*. Nature Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**: p. 801-811.
7. Sala-Valdes, M., et al., *EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins*. J Biol Chem, 2006. **281**(28): p. 19665-75.
8. Barreiro, O., et al., *Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplatforms*. J Cell Biol, 2008. **183**(3): p. 527-42.
9. Berditchevski, F., *Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye*. J Cell Sci., 2001. **114**: p. 4143-51.
10. Hemler, M., *Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain*. Annu Rev Cell Dev Biol., 2003. **19**: p. 397-422.
11. Yanez-Mo, M., M. Mittelbrunn, and F. Sanchez-Madrid, *Tetraspanins and intercellular interactions*. Microcirculation, 2001. **8**(3): p. 153-68.
12. Le Naour, F., et al., *Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice*. Science, 2000. **287**(5451): p. 319-21.
13. Tarrant, J.M., et al., *Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface*. Trends Immunol, 2003. **24**(11): p. 610-7.
14. Berditchevski, F., et al., *A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 2595-8.
15. Zhang, X.A., A.L. Bontrager, and M.E. Hemler, *Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 25005-13.
16. Barreiro, O., et al., *Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2852-61.
17. Berditchevski, F., et al., *Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling*. J Biol Chem., 2002. **277**(40): p. 36991-7000.
18. VanCompernelle, S.E., S. Levy, and S.C. Todd, *Anti-CD81 activates LFA-1 on T cells and promotes T cell-B cell collaboration*. Eur J Immunol, 2001. **31**(3): p. 823-31.
19. Shiomi, T., et al., *Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151*. Lab Invest, 2005. **85**(12): p. 1489-506.

20. Pique, C., et al., *Interaction of CD82 tetraspanin proteins with HTLV-1 envelope glycoproteins inhibits cell-to-cell fusion and virus transmission*. Virology, 2000. **276**(2): p. 455-65.
21. Willett, B., et al., *Inhibition of feline immunodeficiency virus infection by CD9 antibody operates after virus entry and is independent of virus tropism*. J Gen Virol, 1997. **78** ( Pt 3): p. 611-8.
22. Schmid, E., et al., *Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibit canine distemper virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion*. J Virol., 2000. **74**(16): p. 7554-61.
23. von Lindern, J., et al., *Potencial role for CD63 in CCR5-Mediated HIV-1 infection of macrophages*. J. Virol., 2003. **77**(6): p. 3624-3633.
24. Pileri, P., et al., *Binding of hepatitis C virus to CD81*. Science, 1998. **282**(5390): p. 938-941.
25. Mittelbrunn, M., et al., *Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC*. J Immunol, 2002. **169**(12): p. 6691-5.
26. Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh, *Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages*. J Cell Biol., 2003. **162**(3): p. 443-55.
27. Imai, T., et al., *Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1229-39.
28. Maecker, H.T., *Human CD81 directly enhances Th1 and Th2 cell activation, but preferentially induces proliferation of Th2 cells upon long-term stimulation*. BMC Immunol, 2003. **4**(1): p. 1.
29. Witherden, D.A., R. Boismenu, and W.L. Havran, *CD81 and CD28 costimulate T cells through distinct pathways*. J Immunol, 2000. **165**(4): p. 1902-9.
30. Imai, T. and O. Yoshie, *C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells*. J Immunol, 1993. **151**(11): p. 6470-81.
31. Tardif, M.R. and M.J. Tremblay, *Tetraspanin CD81 provides a costimulatory signal resulting in increased human immunodeficiency virus type 1 gene expression in primary CD4+ T lymphocytes through NF-kappaB, NFAT, and AP-1 transduction pathways*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4316-28.
32. Tachibana, I. and M. Hemler, *Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance*. J Cell Biol., 1999. **146**(4): p. 893-904.
33. Kaji, K., et al., *Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion*. Dev Biol, 2002. **247**(2): p. 327-34.
34. Takeda, Y., et al., *Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes*. J Cell Biol, 2003. **161**(5): p. 945-56.
35. Stipp, C.S., T.V. Kolesnikova, and M.E. Hemler, *EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily*. J Biol Chem, 2001. **276**(44): p. 40545-54.
36. Zhang, X.A., et al., *EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(10): p. 2665-74.

37. Kolesnikova, T.V., et al., *EWI-2 modulates lymphocyte integrin alpha4beta1 functions*. Blood, 2004. **103**(8): p. 3013-9.
38. Stipp, C.S., T.V. Kolesnikova, and M.E. Hemler, *EWI-2 regulates alpha3beta1 integrin-dependent cell functions on laminin-5*. J Cell Biol, 2003. **163**(5): p. 1167-77.
39. Bershadsky, A.D., N.Q. Balaban, and B. Geiger, *Adhesion-dependent cell mechanosensitivity*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 677-95.
40. Pavalko, F.M., et al., *Alpha-actinin: a direct link between actin and integrins*. Biochem Soc Trans, 1991. **19**(4): p. 1065-9.
41. Sjoblom, B., A. Salmazo, and K. Djinoovic-Carugo, *Alpha-actinin structure and regulation*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(17): p. 2688-701.
42. Fraley, T.S., et al., *Phosphoinositide binding inhibits alpha-actinin bundling activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 24039-45.
43. Celli, L., et al., *Evidence of a functional role for interaction between ICAM-1 and nonmuscle alpha-actinins in leukocyte diapedesis*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 4113-21.
44. Grootjans, J.J., et al., *Syntenin-syndecan binding requires syndecan-syntenin and the co-operation of both PDZ domains of syntenin*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19933-41.
45. Zimmermann, P., et al., *PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane*. Mol Cell, 2002. **9**(6): p. 1215-25.
46. Latysheva, N., et al., *Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(20): p. 7707-18.
47. Beekman, J.M. and P.J. Coffey, *The ins and outs of syntenin, a multifunctional intracellular adaptor protein*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 9): p. 1349-55.
48. Shirao, T., *The roles of microfilament-associated proteins, drebrins, in brain morphogenesis: a review*. J Biochem, 1995. **117**(2): p. 231-6.
49. Coffin, J.M., *Genetic diversity and evolution of retroviruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **176**: p. 143-64.
50. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
51. Dittmar, M.T., et al., *HIV-1 tropism and co-receptor use*. Nature, 1997. **385**(6616): p. 495-6.
52. Takeuchi, Y., et al., *Host range mutant of human immunodeficiency virus type 1: modification of cell tropism by a single point mutation at the neutralization epitope in the env gene*. J Virol, 1991. **65**(4): p. 1710-8.
53. Rosenberg, Z.F. and A.S. Fauci, *Immunopathogenesis of HIV infection*. FASEB J, 1991. **5**(10): p. 2382-90.
54. Meyaard, L., H. Schuitemaker, and F. Miedema, *T-cell dysfunction in HIV infection: anergy due to defective antigen-presenting cell function?* Immunol Today, 1993. **14**(4): p. 161-4.
55. Clerici, M. and G.M. Shearer, *A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection*. Immunol Today, 1993. **14**(3): p. 107-11.
56. Orenstein, J.M., *In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue*. J Infect Dis, 2000. **182**(1): p. 338-42.
57. Piguet, V. and Q. Sattentau, *Dangerous liaisons at the virological synapse*. J Clin Invest, 2004. **114**(5): p. 605-10.

58. Gallo, S.A., et al., *Temperature-dependent intermediates in HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion revealed by inhibitors that target N- and C-terminal helical regions of HIV-1 gp41*. *Biochemistry*, 2004. **43**(25): p. 8230-3.
59. Fortin, J.F., et al., *Role of the leukocyte function antigen-1 conformational state in the process of human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and virus infection*. *Virology*, 1999. **257**(1): p. 228-38.
60. Pontow, S.E., et al., *Actin cytoskeletal reorganizations and coreceptor-mediated activation of rac during human immunodeficiency virus-induced cell fusion*. *J Virol*, 2004. **78**(13): p. 7138-47.
61. Sylwester, A., et al., *HIV-induced syncytia of a T cell line form single giant pseudopods and are motile*. *J Cell Sci*, 1993. **106** ( Pt 3): p. 941-53.
62. Wang, J.H., C. Kwas, and L. Wu, *Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), but not ICAM-2 and -3, is important for dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission*. *J Virol*, 2009. **83**(9): p. 4195-204.
63. Mok, J.Y., *Vertical transmission*. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 1992. **6**(1): p. 85-100.
64. Kornbluth, R.S., *Significance of T cell apoptosis for macrophages in HIV infection*. *J Leukoc Biol*, 1994. **56**(3): p. 247-56.
65. Iyengar, S., J. Hildreth, and D. Schwartz, *Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells*. *J Virol*, 1998. **72**(6): p. 5251-5.
66. Nabel, G. and D. Baltimore, *An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells*. *Nature*, 1987. **326**(6114): p. 711-3.
67. Cantin, R., S. Methot, and M.J. Tremblay, *Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses*. *J Virol*, 2005. **79**(11): p. 6577-87.
68. Chertova, E., et al., *Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages*. *J Virol*, 2006. **80**(18): p. 9039-52.
69. Beausejour, Y. and M.J. Tremblay, *Envelope glycoproteins are not required for insertion of host ICAM-1 into human immunodeficiency virus type 1 and ICAM-1-bearing viruses are still infectious despite a suboptimal level of trimeric envelope proteins*. *Virology*, 2004. **324**(1): p. 165-72.
70. Esser, M.T., et al., *Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation*. *J Virol*, 2001. **75**(13): p. 6173-82.
71. Tanaka, M., et al., *Downregulation of CD4 is required for maintenance of viral infectivity of HIV-1*. *Virology*, 2003. **311**(2): p. 316-25.
72. Briggs, J.A., et al., *Structure and assembly of immature HIV*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(27): p. 11090-5.
73. Melikyan, G.B., *Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm*. *Retrovirology*, 2008. **5**: p. 111.
74. Gallo, S.A., et al., *The HIV Env-mediated fusion reaction*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1614**(1): p. 36-50.
75. Lehmann, M.J., et al., *Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells*. *J Cell Biol*, 2005. **170**(2): p. 317-25.
76. Jolly, C., et al., *HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse*. *J Exp Med*, 2004. **199**(2): p. 283-93.



77. Jolly, C., I. Mitar, and Q.J. Sattentau, *Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells*. J Virol, 2007. **81**(24): p. 13916-21.
78. Brown, A., et al., *Activation of the PAK-related kinase by human immunodeficiency virus type 1 Nef in primary human peripheral blood lymphocytes and macrophages leads to phosphorylation of a PIX-p95 complex*. J Virol, 1999. **73**(12): p. 9899-907.
79. Janardhan, A., et al., *HIV-1 Nef binds the DOCK2-ELMO1 complex to activate rac and inhibit lymphocyte chemotaxis*. PLoS Biol, 2004. **2**(1): p. E6.
80. Rauch, S., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Nef recruits the guanine exchange factor Vav1 via an unexpected interface into plasma membrane microdomains for association with p21-activated kinase 2 activity*. J Virol, 2008. **82**(6): p. 2918-29.
81. Zhang, H., et al., *Functional interaction between the cytoplasmic leucine-zipper domain of HIV-1 gp41 and p115-RhoGEF*. Curr Biol, 1999. **9**(21): p. 1271-4.
82. Raftopoulou, M. and A. Hall, *Cell migration: Rho GTPases lead the way*. Dev Biol, 2004. **265**(1): p. 23-32.
83. Harada, S., et al., *Influence of membrane fluidity on human immunodeficiency virus type 1 entry*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(2): p. 480-6.
84. Dustin, M.L., *T-cell activation through immunological synapses and kinapses*. Immunol Rev, 2008. **221**: p. 77-89.
85. Monks, C.R., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 82-6.
86. Montoya, M.C., et al., *Cell adhesion and polarity during immune interactions*. Immunol Rev, 2002. **186**: p. 68-82.
87. Haller, C. and O.T. Fackler, *HIV-1 at the immunological and T-lymphocytic virological synapse*. Biol Chem, 2008. **389**(10): p. 1253-60.
88. Martinez-Bartolome, S., et al., *Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(6): p. 1135-45.
89. Jorge, I., et al., *Statistical model to analyze quantitative proteomics data obtained by 18O/16O labeling and linear ion trap mass spectrometry: application to the study of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in endothelial cells*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(5): p. 1130-49.
90. Todd, S.C., et al., *CD81 expressed on human thymocytes mediates integrin activation and interleukin 2-dependent proliferation*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 2055-60.
91. Hioe, C.E., et al., *LFA-1 expression on target cells promotes human immunodeficiency virus type 1 infection and transmission*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 1077-82.
92. Rocha-Perugini, V., et al., *The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1866.
93. Songyang, Z., et al., *Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains*. Science, 1997. **275**(5296): p. 73-7.
94. Rey, M., et al., *Myosin IIA is involved in the endocytosis of CXCR4 induced by SDF-1alpha*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 6): p. 1126-33.
95. Merat, R., et al., *Variable constraints on the principal immunodominant domain of the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol., 1999. **73**(7): p. 5698-706.
96. Grivel, J.C. and L.B. Margolis, *CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1 are equally cytopathic for their T-cell targets in human lymphoid tissue*. Nat Med, 1999. **5**(3): p. 344-6.
97. Blaak, H., et al., *In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established*

- primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(3): p. 1269-74.
98. Ho, S.H., et al., *Recombinant extracellular domains of tetraspanin proteins are potent inhibitors of the infection of macrophages by human immunodeficiency virus type 1*. *J Virol*, 2006. **80**(13): p. 6487-96.
  99. Ouchi, N., et al., *Role of membrane-anchored heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and CD9 on macrophages*. *Biochem J*, 1997. **328** ( Pt 3): p. 923-8.
  100. Chien, M.P., S. Jiang, and D.K. Chang, *The function of coreceptor as a basis for the kinetic dissection of HIV type 1 envelope protein-mediated cell fusion*. *FASEB J*, 2008. **22**(4): p. 1179-92.
  101. Levy, S. and T. Shoham, *Protein-protein interactions in the tetraspanin web*. *Physiology (Bethesda)*, 2005. **20**: p. 218-24.
  102. Loffler, S., et al., *CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus*. *J Virol*, 1997. **71**(1): p. 42-9.
  103. Higginbottom, A., et al., *Structural requirements for the inhibitory action of the CD9 large extracellular domain in sperm/oocyte binding and fusion*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **311**(1): p. 208-14.
  104. Singethan, K., et al., *CD9 clustering and formation of microvilli zippers between contacting cells regulates virus-induced cell fusion*. *Traffic*, 2008. **9**(6): p. 924-35.
  105. de Parseval, A., et al., *Blocking of feline immunodeficiency virus infection by a monoclonal antibody to CD9 is via inhibition of virus release rather than interference with receptor binding*. *J Virol*, 1997. **71**(8): p. 5742-49.
  106. Yi, T., et al., *Tetraspanin CD9 regulates osteoclastogenesis via regulation of p44/42 MAPK activity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **347**(1): p. 178-84.
  107. Kapadia, S.B., et al., *Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I*. *J Virol*, 2007. **81**(1): p. 374-83.
  108. Zilber, M.T., et al., *MHC class II/CD38/CD9: a lipid-raft-dependent signaling complex in human monocytes*. *Blood*, 2005. **106**(9): p. 3074-81.
  109. Song, W., et al., *Enhanced infection of an X4 strain of HIV-1 due to capping and colocalization of CD4 and CXCR4 induced by capsianoside G, a diterpene glycoside*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **283**(2): p. 423-9.
  110. Mohagheghpour, N., et al., *Early activation events render T cells susceptible to HIV-1-induced syncytia formation. Role of protein kinase C*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(11): p. 7233-8.
  111. Weng, J., et al., *Formation of syncytia is repressed by tetraspanins in human immunodeficiency virus type 1-producing cells*. *J Virol*, 2009. **83**(15): p. 7467-74.
  112. Grigorov, B., et al., *A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line*. *Retrovirology*, 2009. **6**: p. 28.
  113. Sato, K., et al., *Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins*. *J Virol*, 2008. **82**(2): p. 1021-33.
  114. Kremontsov, D.N., et al., *Tetraspanins regulate cell-to-cell transmission of HIV-1*. *Retrovirology*, 2009. **6**: p. 64.
  115. Meroni, L., et al., *Altered expression of the tetraspanin CD81 on B and T lymphocytes during HIV-1 infection*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **147**(1): p. 53-9.
  116. Jolly, C. and Q.J. Sattentau, *Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains*. *J Virol*, 2007. **81**(15): p. 7873-84.

117. Barrero-Villar, M., et al., *Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 1): p. 103-13.
118. Wang, J.H., C. Wells, and L. Wu, *Macropinocytosis and cytoskeleton contribute to dendritic cell-mediated HIV-1 transmission to CD4+ T cells*. Virology, 2008. **381**(1): p. 143-54.
119. Liu, Y., N.V. Belkina, and S. Shaw, *HIV infection of T cells: actin-in and actin-out*. Sci Signal, 2009. **2**(66): p. pe23.
120. Jimenez-Baranda, S., et al., *Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(7): p. 838-46.
121. Campbell, E.M., R. Nunez, and T.J. Hope, *Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5745-55.
122. Yoder, A., et al., *HIV envelope-CXCR4 signaling activates cofilin to overcome cortical actin restriction in resting CD4 T cells*. Cell, 2008. **134**(5): p. 782-92.
123. Mazzocca, A., F. Liotta, and V. Carloni, *Tetraspanin CD81-regulated cell motility plays a critical role in intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2008. **135**(1): p. 244-256 e1.
124. Stanley, P., et al., *Intermediate-affinity LFA-1 binds alpha-actinin-1 to control migration at the leading edge of the T cell*. EMBO J, 2008. **27**(1): p. 62-75.
125. Barrero-Villar, M., et al., *PI4P5-kinase Ialpha is required for efficient HIV-1 entry and infection of T cells*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 6882-8.
126. Perugi, F., et al., *Human Discs Large is a new negative regulator of human immunodeficiency virus-1 infectivity*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(1): p. 498-508.
127. Rudnicka, D., et al., *Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses*. J Virol, 2009. **83**(12): p. 6234-46.
128. Gordon-Alonso, M., et al., *Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5129-37.
129. Sowinski, S., et al., *Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(2): p. 211-9.
130. Hubner, W., et al., *Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses*. Science, 2009. **323**(5922): p. 1743-7.
131. Jolly, C., I. Mitar, and Q.J. Sattentau, *Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5547-60.
132. Valenzuela-Fernandez, A., et al., *Histone Deacetylase 6 Regulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection*. Mol Biol Cell, 2005: p. in press as 10.1091/mbc.E05-04-0354.





## **TEXTO SUPLEMENTARIO**

---



### **Video 1**

**Formación de sincitios en el sistema linfoide.** Se pueden observar tres eventos de fusión entre células T CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> (sin marcar) y células T Env<sup>+</sup> (marcadas en rojo con la sonda CMTMR) señalados con una flecha negra antes de que ocurran que se vuelve verde en el momento de la fusión celular. Las fusiones celulares progresivas conducen a la formación de un gran sincitio. Se adquirieron 6 secciones ópticas mediante microscopía confocal que se proyectaron en una sola imagen, cada 15 s durante 2 h.

### **Video 2**

**Formación de sincitios en el sistema HeLa.** Se puede observar una célula verde (HeLa CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> CCR5-GFP) y una célula marcada con una sonda intracelular roja (HeLa Env<sup>+</sup>). La célula verde de partida es ya un sincitio formado por la fusión de células GFP y CMTMR<sup>+</sup>. Se adquirieron 6 secciones ópticas mediante microscopía confocal que se proyectaron en una sola imagen, cada 15 s durante 2 h.

### **Video 3D-1**

**Detalle de la interacción de partículas pseudovirales-GFP (Gag-GFP) con una célula diana CEM 1.3.** Incubación con Gag-GFP 30 min a 4°C antes de ser fijadas con para-formaldehído. CD4 teñido con Ac T4 seguido del Ac secundario GAM-568.

### **Video 3D-2**

**Detalle de la interacción de una partícula pseudoviral-GFP (Gag-GFP) con una célula diana CEM 1.3.** Incubación con Gag-GFP 30 min a 16°C antes de ser fijadas con para-formaldehído. CD4 teñido con Ac T4 seguido del Ac secundario GAM-568. Se puede apreciar la fluorescencia verde de la partícula en ambas caras de la membrana plasmática.

### **Videos 3D-3 y 3D-4**

**Entrada masiva de partículas pseudovirales-GFP (Gag-GFP) en células diana CEM 1.3.** Incubación con Gag-GFP 30 min a 37°C antes de ser fijadas con para-formaldehído. CD4 teñido con Ac T4 seguido del Ac secundario GAM-568. Se observa la acumulación de partículas pseudovirales en una zona determinada de la célula, algunas de estas partículas ya se encuentran en el citosol de la célula.

### **Secuencia en el eje Z de la serie de secciones ópticas reconstruidas en el video 3D-4**

Serie de secciones ópticas adquiridas por microscopia confocal mostrando diferentes partículas pseudovirales-GFP en una misma zona de la célula a lo largo del eje Z.

### **Video 3D-5**

**Célula CEM 1.3 incubada con virus NL4.3 y teñida para Sintenina-1 y CD4.** Se observa el reclutamiento de CD4 a un polo de la célula (fenómeno conocido como *capping*). En este mismo polo existe un enriquecimiento subcortical de Sintenina-1.

#### **Video 3D-6**

**Reclutamiento de Sintenina-1** (teñida usando el Ac anti-Sintenina-1 seguido del Ac secundario GAR-568) **a la zona de interacción entre el virus** (partícula pseudoviral-GFP) **y la membrana plasmática**. Células CEM 1.3 incubadas con las partículas pseudovirales-GFP durante 30 min a 4°C y fijadas en para-formaldehído.

#### **Video 3D-7**

**Sintenina-1 no co-localiza con las partículas pseudovirales-GFP una vez que éstas ya han entrado en la célula diana**. Células CEM 1.3 incubadas con las partículas pseudovirales-GFP durante 30 min a 37°C y fijadas en para-formaldehído. Sintenina-1 se tiñó usando el Ac anti-Sintenina-1 seguido del Ac secundario GAR-568.

## **ARTÍCULOS PUBLICADOS**

---



## ARTÍCULOS PUBLICADOS QUE FORMAN PARTE DE LA TESIS

- Mónica Gordón-Alonso, María Yáñez-Mó, Olga Barreiro, Susana Alvarez, M<sup>a</sup> Ángeles Muñoz-Fernández, Agustín Valenzuela-Fernández and Francisco Sánchez-Madrid. Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *The Journal of Immunology*. 2006 (177; 5129-5137).
- María Yáñez-Mó, Olga Barreiro, Mónica Gordon-Alonso, Mónica Sala-Valdés and Francisco Sánchez-Madrid. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends in Cell Biology* 2009. (9; 434-446).
- Manuel Pérez-Martínez, Mónica Gordón-Alonso, José Román Cabrero, Mercedes Rey, Marta Barrero-Villar, María Mittelbrunn, Amalia Lamana, Giulia Morlino, Hiroyuki Yamazaki, Tomoaki Shirao, Jesús Vázquez, Roberto González-Amaro, Esteban Veiga and Francisco Sánchez-Madrid. Drebrin regulates T cell activation, CXCR4 recruitment to the immune synapse and HIV infection. En revisión en *The Journal of Cell Biology*.
- Syntenin-1 regulates Rac-dependent actin polymerization during immune cognate formation and T cell chemotaxis. Mónica Sala-Valdés\*, Mónica Gordón-Alonso\*, Emilio Tejera, Angeles Ursa, Anna Ibáñez, María Mittelbrunn, J. Román Cabrero, Manuel Pérez-Martínez, Idoia Gimferrer, Carles Serra-Pagès, Francisco Lozano, Francisco Sánchez-Madrid and María Yáñez-Mó. En revisión en *Immunity*. (\*co-autores).





## ARTÍCULOS PUBLICADOS NO INCLUIDOS EN LA TESIS

El trabajo desarrollado por Mónica Gordón Alonso en el laboratorio del Dr. Francisco Sánchez Madrid en el Hospital Universitario de la Princesa ha servido para publicar una serie de artículos, fruto de colaboraciones con otros investigadores, que se exponen a continuación:

- D. Sancho, M. C. Montoya, A. Monjas, M. Gordón-Alonso, T. Katagiri, D. Gil, R. Tejedor, B. Alarcón, and F. Sánchez-Madrid. TCR Engagement Induces Proline-Rich Tyrosine Kinase-2 (Pyk2) Translocation to the T Cell-APC interface independently of Pyk2 activity and in an immuno-receptor Tyrosine-based activation motif-mediated. *The Journal of Immunology*. 2002 (169; 292-300)
- D. Sancho, M. Vicente-Manzanares, M. Mittelbrunn, M. C. Montoya, M. Gordón-Alonso, J. M. Serrador, and F. Sánchez-Madrid. Regulation of microtubule-organizing centre reorientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions. *Immunological reviews*.
- D. Sancho, M. Gómez-Gutiérrez, F. Vezma, E. Espulgues, M. Gordón-Alonso, M.A. García-López, C. Martínez-A, P. Lauzurica, F. Sánchez-Madrid. CD69 down-regulates immune reactivity through active TGF-beta1 production in collagen-induced arthritis. *Journal of Clinical Investigations*. 112:872-882 (2003).
- A. Valenzuela-Fernández, S. Álvarez, M. Gordón-Alonso, J. Román Cabrero, G. Fernández, S. Naranjo-Suárez, J. M. Serrador, M. A. Muñoz-Fernández, and F. Sánchez-Madrid. Host cell HDAC6-tubulin deacetylase controls HIV-1 infection and syncytia formation. *Molecular Biology of the Cell*. 2005 (16:5445-5454).
- N. B. Martín-Cófreces, D. Sancho, E. Fernández, M. Vicente-Manzanares, M. Gordón-Alonso, M. C. Montoya, F. Michel, O. Acuto, B. Alarcón, and F. Sánchez-Madrid. Critical role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR. *The Journal of Immunology*. 2006 (176; 4201-4207).
- N. B. Martín-Cófreces, J. Robles-Valero, JR. Cabrero, M. Mittelbrunn, M. Gordón-Alonso, CH. Shung, B. Alarcón, J. Vázquez, and F. Sánchez-Madrid. MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *Journal of Cell Biology*. 2008 Sep 8; 182(5):951-62.
- M. Barrero-Villar, JR. Cabrero, M. Gordón-Alonso, J. Barroso-González, S. Álvarez-Losada, MA. Muñoz-Fernández, F. Sánchez-Madrid, A. Valenzuela-Fernández. Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes. *Journal of Cell Science*. 2009 Jan 1; 122(Pt 1):103-113.

- M. Barrero-Villar, J. Barroso-González, JR. Cabrero, M. Gordón-Alonso, S. Álvarez-Losada, MA. Muñoz-Fernández, F. Sánchez-Madrid, A. Valenzuela-Fernández. PI4P5-kinase Ialpha is required for efficient HIV-1 entry and infection of T cells. *The Journal of Immunology*. 2008 Nov 15; 181(10):6882-6888.